บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 ขยายพันธุ์โดยการผสมตัวเอง

นำต้นกล้าผักกาดขาวปลีสายพันธุ์ 23-3-4 , 27-3-7, 40-9 และ 142-5 ที่ได้รับอุณหภูมิ 4 – 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน ย้ายปลูกลงในถุงเพาะกล้า เมื่อต้นกล้าผักกาดขาวปลีมีใบจริง 4 - 5 ใบ จึงย้ายปลูกลงในแปลงขนาด 2 x 2 เมตร ปลูกแปลงละ 6 ต้น โดยปลูกเป็นแถวๆ ละ 3 ต้น จนกระทั่งต้นผักกาดขาวปลีมีอายุ 30 วันก็จะเริ่มออกดอก ให้นำมุ้งพลาสติกขนาด 2 x 2 x 2 เมตร คลุมแปลงเพื่อกันแมลง และต้นผักกาดขาวปลีออกดอกพร้อมกันแล้ว ถ่ายเรณูในต้นเดียวกันขณะดอกอ่อนจำนวน 3 – 4 ช่อต่อต้น แล้วคลุมด้วยถุงกระดาษไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ จึงเอาถุงกระดาษออก ปล่อยให้มีการพัฒนาจนฝักเริ่มแก่มีสีน้ำตาลอ่อนจึงเก็บมาผึ่งลมให้แห้ง และแกะฝักเอาเมล็ดออกมา เอาสิ่งที่เจือปนออกจากเมล็ดให้หมด นำเมล็ดไปชั่งน้ำหนักและเก็บในถุงกระดาษ ปิดผนึกให้สนิท เก็บในตู้เย็นเพื่อนำไปใช้ต่อไป

การทดลองที่ 2 การถ่ายเรณูข้ามแบบสลับพ่อแม่ของผักกาดขาวปลีสายพันธุ์ต่างๆ

การทดลองที่ 2.1 การผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่หนึ่ง

นำต้นกล้าผักกาดขาวปลีสายพันธุ์ 23-3-4 , 27-3-7, 40-9 และ 142-5 ที่ได้รับอุณหภูมิ 4 - 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน ย้ายปลูกลงในถุงเพาะกล้า เมื่อต้นกล้าผักกาดขาวปลีมีใบจริง 4 - 5 ใบ จึงย้ายปลูกลงในแปลงขนาด 2 x 2 เมตร แต่ละแปลงปลูก 2 พันธุ์ๆ ละ 6 ต้น โดยปลูกเป็นแถวๆ ละ 3 ต้น สลับพันธุ์กัน (ดังรูปที่ 3.1) ระยะปลูก 40 x 50 เซนติเมตร จนกระทั่งต้นผักกาดขาวปลีมีอายุ 30 วัน ก็จะเริ่มออกดอก นำมุ้งพลาสติกขนาด 2 x 2 x 2 เมตร คลุมแปลงแต่ละคู่ผสมไว้เพื่อกันแมลง ถ่ายเรณูโดยวิธีการถ่ายเรณูด้วยมือในช่วงแรก เมื่อต้นผักกาดขาวปลีออกดอกมากพอสมควร นำกล่องรังผึ้งที่มีจำนวนผึ้งมากพอมาวางในแปลง เพื่อช่วยถ่ายเรณูระหว่างพันธุ์พ่อแม่ จนกระทั่งดอกใกล้หมดจึงนำผึ้งออกจากแปลง ปล่อยให้มีการเจริญ และพัฒนาของฝักต่อไป เมื่อฝักเริ่มแก่ มีสีน้ำตาลอ่อน ให้เก็บฝักแต่ละต้นในแปลงแยกออกเป็น

2 คู่ผสม คือ คู่ผสมแรกจะเก็บฝักในแถวที่ 1 และ 3 ส่วนคู่ผสมที่ 2 จะเก็บฝักในแถวที่ 2 และ 4 จากนั้นนำเมล็ดมาผึ่งลมให้แห้งและแกะฝักเอาเมล็ดออกมา เอาสิ่งเจือปนออกจากเมล็ดให้หมด นำเมล็ดไปชั่งน้ำหนักและเก็บในถุงกระดาษปิดผนึกให้สนิท เก็บในตู้เย็นเพื่อนำไปใช้ต่อไป

1	2	3	4
X	O	X	O
X	O	X	O
X	O	X	O

X หมายถึง สายพันธุ์ที่ 1

O หมายถึง สายพันธุ์ที่ 2

รูปที่ 3.1 แผนผังการปลูกผักกาดขาวปลีเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมแบบสลับพ่อแม่

การทดลองที่ 2.2 ทดสอบเปรียบเทียบผักกาดขาวปลีพันธุ์ลูกผสม

ทำการทดลองในแปลงทดลอง ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระว่างวันที่ 25 เดือนกันยายน 2541 ถึง วันที่ 27 เดือนธันวาคม 2541 โดยปลูกผักกาดขาวปลีพันธุ์ลูกผสม 11 พันธุ์ ได้แก่ 23x27, 23x142, 27x23, 27-3-7x23-3-4, 27-3-7x40-9, 27-3-7x142-5, 40-9x23-3-4, 40-9x27-3-7, 40-9x142-5, 142x23 และ 142-5x40-9 สำหรับพันธุ์ตราช้าง, บอมบ์ 159 และ เทพา 23 ตราปลาคู่ เป็นพันธุ์มาตรฐาน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ในบล็อค (randomized complete block design ; RCBD) จำนวน 3 ซ้ำ มีรายละเอียดดังนี้

- การเตรียมต้นกล้า เพาะเมล็ดผักกาดขาวปลีในกระบะพลาสติก ใช้ดินร่วน ขุยมะพร้าว และขี้เถ้าแกลบ อัตรา 1:1:1 เป็นวัสดุเพาะ แยกเพาะกระบะพันธุ์ละ 100 เมล็ด เมื่อต้นกล้าอายุ 30 วัน คัดต้นที่สมบูรณ์และมีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันย้ายลงปลูกในแปลง

- การเตรียมพื้นที่ เตรียมแปลงขนาด 1 x 2 เมตร ระยะห่างระหว่างแปลง 1 เมตร จำนวน 49 แปลง โดยแบ่งเป็นแปลงทดสอบพันธุ์ลูกผสมกับพันธุ์มาตรฐานจำนวน 42 แปลง และแปลงปลูกพันธุ์พ่อแม่ของพันธุ์ลูกผสมจำนวน 7 แปลง ใส่ปุ๋ยคอกอัตรา 1000 กิโลกรัมต่อไร่

ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 อัตรา 50 กิโลกรัมต่อไร่ และฟูราดาน 3 จี อัตรา 3 กิโลกรัมต่อไร่ คลุกเคล้าให้เข้ากับดิน ใช้ฟางข้าวคลุมแปลงเพื่อช่วยป้องกันวัชพืชและรักษาความชื้นในดิน ขุดหลุมปลูกระยะ 40 x 50 เซนติเมตร รวมปลูกแปลงละ 8 ต้น ทำแปลงปลูกผักกาดขาวปลีพันธุ์มาตรฐานเป็นแถวคู่รอบแปลงในแต่ละซ้ำ เพื่อป้องกันอิทธิพลจากสภาพแวดล้อมรอบๆ แปลงปลูกและอันตรายที่จะเกิดขึ้นกับต้นผักกาดขาวปลี ขุดหลุมปลูกระยะ 50 x 50 เซนติเมตร

- การปฏิบัติดูแลรักษา ใส่ปุ๋ย 2 ครั้ง คือ ครั้งแรกสูตร 15-15-15 ผสมปุ๋ยคอกรองพื้นก่อนปลูกดังกล่าวข้างต้น ครั้งที่ 2 สูตร 15-15-15 ผสมกับสูตร 46-0-0 อัตราส่วน 1:1 ใช้อัตรา 50 กิโลกรัมต่อไร่ โรยรอบโคนต้นพร้อมพรวนดินกลบโคนหลังย้ายปลูก 15 วัน การพรวนดินและกำจัดวัชพืชในแปลงกระทำพร้อมกับการใส่ปุ๋ยครั้งที่ 2 ให้น้ำโดยใช้สายยางรดน้ำ พ่นสารเคมีป้องกันกำจัดโรคและแมลง เช่นเดียวกับการปลูกผักกาดขาวปลีโดยทั่วไป

- การบันทึกผลการทดลอง เก็บเกี่ยวผลผลิตทั้งหมดพร้อมกัน หลังจากย้ายปลูกต้นกล้าได้ 50 วัน โดยเก็บข้อมูลจาก 8 ต้น ได้แก่

1. น้ำหนักปลีก่อนตัดแต่งเฉลี่ย
2. น้ำหนักหลังตัดแต่งเฉลี่ย (mean head weight ; MHW)
3. ความกว้างปลีเฉลี่ย (d_1)
4. ความยาวปลีเฉลี่ย (d_2)
5. ดรรชนีรูปร่างปลี (head shape index ; HSI)

   ดรรชนีรูปร่างปลี = ความยาวปลี / ความกว้างปลี
6. ความกว้างลำต้นเฉลี่ย
7. ความยาวลำต้นเฉลี่ย
8. ดรรชนีรูปร่างลำต้น(stem shape index ; SSI)

   ดรรชนีรูปร่างลำต้น = ความยาวลำต้น / ความกว้างลำต้น
9. ความแน่นปลี (solidity)

   ความแน่นปลี = $MHW / 0.524\ d_1^2\ d_2$
10. เปอร์เซ็นต์การตัดแต่ง
11. ความต้านทานโรคเน่า
12. ลักษณะทางพืชสวนอื่นๆ

การทดลองที่ 3 การทดสอบลักษณะการผสมตัวเองไม่ได้โดยวิธี seed set analysis และ fluorescent microscope technique

การทดลองที่ 3.1 การทดสอบลักษณะการผสมตัวเองไม่ได้โดยวิธี seed set analysis

นำต้นกล้าผักกาดขาวปลีสายพันธุ์ 23, 23-3-4, 27, 27-3-7, 40-9, 142 และ 142-5 ที่ได้รับอุณหภูมิ 4 – 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน ย้ายปลูกลงในถุงเพาะกล้า เมื่อต้นกล้าผักกาดขาวปลีมีใบจริง 4 – 5 ใบ จึงย้ายปลูกลงในแปลง โดยปลูกพันธุ์ละ 10 ต้น จนกระทั่งต้นผักกาดขาวปลีมีอายุ 30 วัน จึงเริ่มออกดอก เลือกช่อดอกที่สมบูรณ์ 3 – 4 ช่อต่อต้น โดยในแต่ละช่อให้มีดอกบาน 3 – 4 ดอก เด็ดดอกบานทิ้งแล้วคลุมช่อดอกด้วยถุงกระดาษ หลังจากนั้น 3 – 5 วัน เปิดถุงกระดาษออก เลือกดอกอ่อนที่พร้อมจะบานภายใน 2 – 3 วัน และดอกบานอย่างละ 10 ดอก ใช้ไหมพรมผูกระหว่างดอกทั้งสอง เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายในเวลาเก็บเกี่ยว ถ่ายเรณูดอกอ่อนและดอกบานโดยใช้ละอองเรณูจากดอกในต้นเดียวกัน แล้วคลุมด้วยถุงกระดาษไว้ตามเดิม หลังจากการถ่ายเรณู 1 สัปดาห์จึงเอาถุงกระดาษออก ปล่อยให้มีการพัฒนาจนกระทั่งฝักแก่มีสีน้ำตาลอ่อน นำมาผึ่งลมให้แห้ง ตรวจนับจำนวนฝักและจำนวนเมล็ดที่เจริญจากดอกอ่อนและดอกบานมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด ตามสมการข้างล่างนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด} = \frac{\text{ผลรวมของจำนวนเมล็ดจาก 5 ฝักของดอกบานจำนวน 3 ช่อ}}{\text{ผลรวมของจำนวนเมล็ดจาก 5 ฝักของดอกตูมจำนวน 3 ช่อ}} \times 100$$

โดย เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดน้อยกว่า 50 % เป็นพวกผสมตัวเองไม่ได้
เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดน้อย 51 - 75 % เป็นพวกผสมตัวเองไม่ได้ปานกลาง
เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดมากกว่า 75 % เป็นพวกผสมตัวเองได้

การทดลองที่ 3.2 การทดสอบลักษณะผสมตัวเองไม่ได้โดยวิธี fluorescent microscope technique

นำผักกาดขาวปลีสายพันธุ์ 23 , 23-3-1, 23-3-4 , 27 , 27-3-7 , 40, 40-9 , 142 และ 142-5 ที่ได้รับอุณหภูมิ 4 – 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน ซึ่งออกดอกโดยไม่ต้องเข้าปลีมาทดสอบ

ลักษณะการผสมตัวเองไม่ได้ พันธุ์ละ 10 ต้น แต่ละต้นใช้ดอกตูมและดอกบานอย่างละ 9 ดอก แบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มควบคุม ดอกตูม และดอกบานไม่ได้รับการถ่ายเรณู

2. กลุ่มถ่ายเรณูในต้นเดียวกัน ดอกตูม และดอกบานได้รับการถ่ายเรณูด้วยละอองเรณูในต้นเดียวกัน

3. กลุ่มถ่ายเรณูข้าม ดอกอ่อน และดอกตูมได้รับการถ่ายเรณูด้วยละอองเรณูของพันธุ์อื่น

ขั้นตอนการทดลอง

1. การคลุมช่อดอกเพื่อป้องกันการผสมเกสร

คัดเลือกช่อดอกที่สมบูรณ์ ไม่มีโรคและแมลงเข้าทำลาย เด็ดดอกบานทิ้งเหลือเฉพาะดอกตูม นำถุงกระดาษที่สะอาดคลุมช่อดอกและใช้คลิปหนีบปากถุงกระดาษให้แน่นเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของละอองเรณูจากที่อื่นเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นเขียนป้ายชื่อพันธุ์และหมายเลขต้นจนครบ 10 ต้นในแต่ละพันธุ์

2. การเตรียมสารละลายอิ่มตัวโปแตสเซียมไดโครเมต

เตรียมโปแตสเซียมไดโครเมต [Potassium dicromate ($K_2Cr_2O_7$)] อิ่มตัว โดยผสมกับน้ำและให้ความร้อน เทใส่จานแก้ว (petri dishes) ประมาณ 1/3 ของความสูงของจานแก้ว ขณะที่ยังร้อนอยู่แล้วปิดฝาทิ้งไว้ให้เย็น จุดประสงค์ของการใช้สารละลายอิ่มตัวโปแตสเซียมไดโครเมตเพื่อรักษาความชื้นในบรรยากาศภายในจานแก้วให้มีความชื้นสัมพัทธ์ 98 % ซึ่งเป็นความชื้นที่เหมาะสมสำหรับการงอกของละอองเรณู

3. การเก็บดอกที่คลุมช่อดอกไว้แล้ว

เตรียมจานแก้ว 2 อัน เพื่อใช้เก็บดอกตูมและดอกบานในแต่ละต้น พร้อมทั้งเขียนชื่อพันธุ์และหมายเลขต้น จากนั้นเอาถุงกระดาษที่คลุมช่อดอกออก เก็บดอกตูมและดอกบานแยกในแต่ละจานแก้ว ในการเก็บดอกควรจะเก็บดอกตูมก่อนให้ครบทั้ง 10 ต้น แล้วจึงเก็บดอกบานต่อจนครบ ล้างมือก่อนเก็บดอกในพันธุ์อื่นๆ เพื่อป้องกันการปนเปื้อน การเก็บดอกควรทำอย่างรวดเร็วเพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำ เพราะอาจทำให้ดอกเหี่ยวได้ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุทำให้ประสิทธิภาพการถ่ายเรณูลดลง ควรหยดน้ำกลั่นลงในจานแก้ว 1 – 2 หยด ก่อนการเก็บดอก

4. การถ่ายเรณูในต้นเดียวกันและข้ามต้น

นำดอกที่เก็บได้ เอาส่วนของกลีบดอกและเกสรเพศผู้ออกให้หมด เหลือเฉพาะก้านดอกและส่วนของก้านเกสรเพศเมียเท่านั้น การถ่ายเรณูในต้นเดียวกันให้ถ่ายเรณูในดอกตูมก่อน แล้วจึงถ่ายเรณูในดอกบานเพื่อป้องกันการปนเปื้อน และใช้ละอองเรณูจากดอกเดียวกันหรือต้นเดียวกัน

สำหรับดอกที่ถ่ายเรณูข้ามต้นจะใช้ละอองเรณูจากพันธุ์อื่นมาถ่ายเรณู ส่วนกลุ่มควบคุมจะไม่มีการถ่ายเรณู เมื่อถ่ายเรณูเสร็จแล้ว วางดอกที่เตรียมไว้แล้วบนสไลด์ซึ่งอยู่บนแท่งแก้วภายใน จานแก้วที่มีสารละลายอิ่มตัวโปแตสเซียมไดโครเมต การทดลองแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มถ่ายเรณูในต้นเดียวกัน และกลุ่มถ่ายเรณูข้ามต้น โดยจานแก้วแต่ละอันจะมีดอกตูม 3 ดอก และดอกบาน 3 ดอก การวางตำแหน่งของดอกบนสไลด์จะแยกดอกตูม และดอกบานไว้คนละด้านของกระจกสไลด์ ในการวางดอกต้องไม่ให้ดอกสัมผัสถูกสารละลายซึ่งจะทำให้ดอกเสียหายใช้ไม่ได้ จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. การทำให้เนื้อเยื่อนิ่มและหยุดกิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์พืช

เมื่อครบ 24 ชั่วโมงแล้ว นำดอกแยกใส่ในหลอดทดลองที่เตรียมไว้ให้ตรงกับป้ายที่ติดบนจานแก้ว โดยแต่ละหลอดทดลองจะมีดอกจำนวน 6 ดอก หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 N ลงไปให้ท่วมดอกในหลอดทดลอง และนำไปต้มในอ่างต้มน้ำ (water bath) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ให้สังเกตสีของชิ้นส่วนดอกจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลืองอ่อนๆ หลังจากต้มเสร็จแล้ว นำหลอดทดลองออกมาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อเตรียมทำขั้นตอนต่อไป

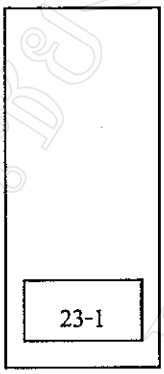
6. การย้อมสี

นำหลอดทดลองที่ผ่านขั้นตอนที่ 5 แล้วเทสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ออกให้หมด ล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง เติมสารละลาย aniline blue 0.2 % ที่ละลายใน K_3PO_4 2 % ลงในหลอดทดลองให้ท่วม ปิดฝาหลอดให้สนิท นำไปเก็บในตู้เย็นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7. การทำสไลด์

นำชิ้นส่วนดอกที่แช่ใน aniline blue มาทำสไลด์ ซึ่งจะใช้เฉพาะส่วนของเกสรเพศเมียเท่านั้น โดยใช้เข็มเขี่ยปลายแหลมแยกเกสรเพศเมียออกจากก้านดอก แล้วนำไปวางบนสไลด์ที่แสดงรายละเอียด หมายเลขพันธุ์และต้นไว้แล้ว ดังรูปที่ 3.2 วางเกสรเพศเมียของดอกตูมและดอกบานสลับกัน ในการทดลองนี้ให้ดอกตูมหันปลายยอดเกสรเพศเมียไปทางด้านขวาและอยู่แถวบน ส่วนดอกบานหันปลายยอดเกสรเพศเมียไปทางด้านซ้ายและอยู่แถวล่าง เพื่อป้องกันยอดเกสรเพศเมียบางส่วนที่หลุดออกมาปะปนกัน ซึ่งจะทำให้การนับจำนวนหลอดเรณูที่งอกลงในก้านเกสรเพศเมียผิดพลาดได้ หลังจากนั้นให้หยดกลีเซอรอล 1 – 2 หยด ลงบนเกสรเพศเมียปิดด้วย coverglass แล้ว squash ระวังอย่าให้ฟองอากาศเกิดขึ้น จากนั้นปิดขอบ coverglass ด้วยน้ำยาทาเล็บแบบใส แล้วตรวจสอบในขั้นตอนต่อไป หากต้องรอตรวจในขั้นตอนต่อไปให้นำสไลด์เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ

8. การตรวจหาหลอดเรณูในก้านเกสรเพศเมียโดยใช้ fluorescent microscope นำสไลด์ที่เตรียมไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้แสง fluorescent ที่ความเข้มแสง 100 W ซึ่งได้เปิดเครื่องกำเนิดแสงเป็นเวลา 15 นาทีก่อนการตรวจสอบ จากนั้นตรวจนับจำนวนละอองเรณูที่งอกและจำนวนหลอดเรณูที่เจริญ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 10 เท่า



หมายเลข 23 หมายถึง ชื่อพันธุ์ และหมายเลข 1 หมายถึง เลขที่ต้น

รูปที่ 3.2 การเขียนชื่อพันธุ์และหมายเลขต้นบนกระจกสไลด์

9. การบันทึกผลการทดลอง

ทำการบันทึกผลการงอกของละอองเรณูดังนี้ คือ ไม่มีละอองเรณูเลยหรือมีแต่ไม่งอก มีละอองเรณูงอก 1 - 10 อัน มีละอองเรณูงอก 11 - 20 อัน และมีละอองเรณูงอกมากกว่า 21 อัน โดยบันทึกเป็นเปอร์เซ็นต์ ดังนี้ คือ

1. ไม่พบหลอดเรณูเลย	ผสมตัวเองไม่ได้
2. พบหลอดเรณูจำนวนเล็กน้อย (30 %)	ผสมตัวเองไม่ได้
3. พบหลอดเรณูไม่เกิน ½ ของละอองเรณูที่งอก (50 %)	ผสมตัวเองไม่ได้ปานกลาง
4. พบหลอดเรณูมากกว่า ½ ของละอองเรณูที่งอก (80 %)	ผสมตัวเองได้
5. พบหลอดเรณูมากพอๆ กับละอองเรณูที่งอก (100 %)	ผสมตัวเองได้

การทดลองที่ 4 การจำแนกพันธุ์โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

1. การเตรียมตัวอย่างพืช

นำผักกาดขาวปลีสายพันธุ์แท้ 7 พันธุ์ ซึ่งใช้เป็นสายพันธุ์พ่อแม่ในการปรับปรุงพันธุ์ผักกาดขาวปลีในครั้งนี้ ได้แก่ 23, 23-3-4, 27, 27-3-7, 40-9, 142 และ 142-5 และพันธุ์ลูกผสมจำนวน 11 พันธุ์ ได้แก่ 23x27, 23x142, 27x23, 27-3-7x23-3-4, 27-3-7x40-9, 27-3-7x14-5, 40-9x23-3-4, 40-9x27-3-7, 40-9x142-5, 142x23 และ142-5x40-9 ปลูกในถาดเพาะกล้า เมื่อต้นกล้ามีใบได้ 10 – 13 ใบ นำใบอ่อนส่วนยอดประมาณ 3 - 4 ใบ มาชั่งน้ำหนัก 2 กรัม แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

2. การสกัดสารตัวอย่างพืช

นำใบผักกาดขาวปลีที่ผ่านการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส มาบดในโกร่งพร้อมกับเติมไนโตรเจนเหลวเพื่อให้ใบกรอบและบดง่ายขึ้น ใส่สารสกัดเอนไซม์ 3 มิลลิลิตร บดให้ละเอียดจนเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปแยกส่วนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ดูดเอา supernatant ที่ได้นำมาเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง แล้วจึงดูดเอา supernatant ที่ได้เก็บไว้ในหลอดทดลอง แล้วนำไปไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส โดยจะแบ่ง supernatant ที่ได้ทั้งหมดใส่หลอดทดลองไว้ในปริมาณ 135 ไมโครลิตรต่อหลอด เพื่อที่จะใช้ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแต่ละครั้งให้เพียงพอ และจะทำให้เอนไซม์ไม่เสื่อมสภาพเร็วเนื่องจากการนำเอนไซม์ออกมาจากตู้เย็น เมื่อจะทำการวิเคราะห์จึงผสม supernatant 90 เปอร์เซ็นต์กับ marker 10 เปอร์เซ็นต์ เขย่าให้เข้ากัน

3. การเตรียมเจล

ประกอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส ใส่ running gel ที่เตรียมไว้สูงเท่าระดับลูกศร แล้วใส่น้ำกลั่นจำนวนเล็กน้อย เพื่อทำให้ผิวหน้าของเจลเรียบ ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อรอให้เจลเกิดโพลีเมอไรเซชัน แล้วใส่ stacking gel พร้อมกับเสียบ comb ขนาดจำนวน 10 ช่อง ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อรอให้เจลเกิดโพลีเมอไรเซชันอีกครั้ง จึงนำเอา comb ออก แล้วล้างผิวหน้าเจลด้วยน้ำกลั่น

4. การประกอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส

ประกอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส เติม electrode buffer ลงใน chamber ให้ระดับของ electrode buffer อยู่เหนือขอบกระจกด้านล่าง ประมาณ 1 - 2 นิ้ว และเติม electrode buffer ให้พอดีกับขอบกระจกด้านบน เพื่อให้เกิดการเคลื่อนที่ของประจุ

5. การหยอดตัวอย่าง

เขย่าสารตัวอย่างที่เตรียมไว้ให้เข้ากัน หยอดสารตัวอย่างลงบนเจลในแต่ละช่องๆ ละ 1 ตัวอย่างๆ ละ 100 ไมโครลิตร ระวังอย่าให้สารตัวอย่างฟุ้งกระจาย ปิดฝาครอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส ต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

6. การผ่านกระแสไฟฟ้า

ในช่วงแรก ใช้กระแสไฟฟ้าที่ 30 มิลลิแอมแปร์ เมื่อสารตัวอย่างที่มี marker เคลื่อนที่ใน stacking gel เป็นแนวเส้นตรงแล้วจึงเปลี่ยนมาใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ที่ 250 – 300 โวลต์ รอจนกระทั่งระดับของ marker อยู่ห่างจากขอบด้านล่างของกระจกประมาณ 2 - 3 เซนติเมตร จึงหยุดจ่ายกระแสไฟฟ้า แล้วนำเจลออกจากชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส

7. การย้อมสี

นำแผ่นเจลที่ได้มาแกะแผ่นกระจกที่ประกบเจลออก แล้วตัดมุมล่างของเจลด้านขวา ถ้าเจลติดอยู่บนกระจกแผ่นใหญ่เพื่อทำเครื่องหมายลำดับของตัวอย่าง นำเจลลงแช่ในสารละลายสำหรับย้อมสีในที่มืด เพื่อทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นของเอนไซม์แต่ละชนิด ดังนี้

7.1 เอนไซม์ acid phosphatase

1. acetate buffer 0.5 M pH 4.8	150.0	มิลลิลิตร
2. fast blue-B salt	150.0	มิลลิกรัม
3. 1% -napthyl acid phosphate(monosodiumsalt)	150.0	มิลลิกรัม
4. $MgCl_2$ 10 %	10	หยด

นำสารในข้อ 1, 2 และ 3 ละลายให้เข้ากัน กรองในที่มืดแล้วเติมสารในข้อ 4 ลงไป ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเทสารละลายสีย้อมลงไปในกล่องพลาสติกที่มีเจลอยู่ให้ท่วม เขย่าเบาๆ วางไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนเห็นแถบสีคมชัด จึงเทสารละลายย้อมสีออกให้หมด แล้วเทสารละลาย acetic acid 7 % ที่มีส่วนผสมของ acetic acid : กลีเซอรอล : น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 7 : 10 : 83 ให้ท่วมแผ่นเจล เพื่อล้างสีส่วนเกินออกและคงสภาพของสีเอาไว้

7.2 เอนไซม์ esterase

1. phosphate buffer 0.1 M pH 6.0	150.0	มิลลิลิตร
2. fast blue-B salt	225.0	มิลลิกรัม
3. 1% napthyl acetate ใน absolute alcohol	4.5	มิลลิลิตร

นำสารในข้อ 1 และ 2 ละลายให้เข้ากัน กรองในที่มืด แล้วเติมสารในข้อ 3 ลงไป ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเทสารละลายสีย้อมลงไปในกล่องพลาสติกที่มีเจลอยู่ให้ท่วม เขย่าเบาๆวางไว้

ในที่มืด จนเห็นแถบสีคมชัด จึงเทสารละลายย้อมสีออกให้หมด แล้วเทสารละลาย acetic acid 7 % ให้ท่วมแผ่นเจล เพื่อล้างสีส่วนเกินออกและคงสภาพของสีเอาไว้

7.3 เอนไซม์ peroxidase

stock A : 3 amino-9 ethylcarbazole	420.0	มิลลิกรัม
β-napthol	290.0	มิลลิกรัม
acetone	200.0	มิลลิลิตร

นำสารทั้งหมดละลายให้เข้ากัน

stock B : tris buffer 0.1 M pH 4.0		
tris-hydroxymethyl aminomethane	3.78	กรัม
acetic acid	4.05	มิลลิลิตร

นำสารทั้งหมดละลายให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นให้ครบ 2.5 ลิตร ที่ pH 4.0

stock C : H_2O_2 3 %		
H_2O_2 30 %	10.0	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

นำ stock A : stock B : stock C ในอัตราส่วน 20 : 80 : 1 ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเทสารละลายสีย้อมลงไปในกล่องพลาสติกที่มีเจลอยู่ให้ท่วม เขย่าเบาๆ วางไว้ในที่มืด จนเห็นแถบสีคมชัด จึงเทสารละลายย้อมสีออกให้หมด แล้วเทสารละลาย acetic acid 7 % ให้ท่วมแผ่นเจล เพื่อล้างสีส่วนเกินออกและคงสภาพของสีเอาไว้

8. การบันทึกข้อมูล

การวัดระยะทางที่เกิดแถบสีแต่ละแถบของไอโซไซม์และระยะทางที่สารตัวอย่างที่มี marker เคลื่อนที่ และบันทึกการแสดงออกของไอโซไซม์แต่ละชนิดของพันธุ์ผักกาดขาวปลีที่ได้เป็นภาพถ่ายของแถบสี และวาดแผนภาพ zymogram ของไอโซไซม์ดังกล่าว แสดงตำแหน่ง จำนวน และขนาดของแถบสี วัดการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของแถบสี ตามสมการข้างล่างนี้

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