บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 การตรวจสอบลักษณะการผสมตัวเองไม่ติดโดยการใช้กล้องจุลทัศน์ (fluorescent microscope technique)

1. การเตรียมดอก

คัดเลือกดอกที่สมบูรณ์ไม่มีแมลงเข้าทำลาย เด็ดดอกที่บานแล้วทิ้งให้หมดเหลือไว้แต่ดอกตูม ทำการคลุมดอกด้วยถุงกระดาษหนีบด้วยคลิ๊ปให้แน่น เพื่อป้องกันไม่ให้เกสรจากที่อื่นปลิวมาผสม คลุมทิ้งไว้ประมาณ 1 – 2 วัน เมื่อถึงเวลานำดอกที่คลุมไว้มีทั้งดอกตูมดอกบานใส่ในจานเลี้ยงที่ติดเบอร์พันธุ์และเลขที่ต้น โดยแต่ละพันธุ์ทำ 10 ต้น แต่ละต้นใช้ดอกตูม 9 ดอก ดอกบาน 9 ดอก

2. การเตรียมความชื้นสัมพัทธ์ 98 %

ต้ม potassium dicromate ($K_2Cr_2O_7$) กับน้ำจนอิ่มตัวเทใส่จานเลี้ยงขณะยังร้อนอยู่ประมาณครึ่งหนึ่งของจานเลี้ยงปิดฝาทิ้งไว้ให้เย็นจะได้ ความชื้นสัมพัทธ์ 98 %

3. การผสมเกสร

นำดอกที่ได้จากขั้นตอนแรกมาทำการผสม โดยแยกทำดอกตูมก่อนดอกบานเพื่อป้องกันไม่ให้ยอดเกสรตัวเมียปนเปื้อนเกสรอื่น โดยก่อนการผสมจะเอาส่วนของกลีบดอกและอับละอองเกสรตัวผู้ ออกให้หมดเหลือก้านดอกและส่วนของ เกสรตัวเมีย

นำดอกที่เตรียมมาทำการผสมโดยแยกออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม (control) ไม่ได้รับการผสมทั้งดอกตูมดอกบาน กลุ่มที่ทำการผสมตัวเอง (self – pollination) โดยใช้ละอองเกสรจากดอกเดียวกันหรือจากต้นเดียวกันมาผสมทั้งดอกตูมและดอกบาน และกลุ่มสุดท้ายกลุ่มที่ทำการผสมข้าม (cross – pollination) จะใช้เกสรจากพันธุ์อื่นมาผสมทั้งดอกตูม และดอกบาน

นำดอกที่ทำการผสมแล้ววางไว้บนสไลด์ซึ่งอยู่บนแท่งแก้วภายในจานเลี้ยงที่มีสารละลายอิ่มตัวของ potassium dicromate เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง

4. การทำให้เนื้อเยื่ออ่อนนุ่ม

นำดอกที่เลี้ยงไว้ครบ 24 ชั่วโมง แยกใส่ในหลอดแก้ว (test tube) คือ กลุ่มควบคุม ดอกตูมและดอกบาน 1 หลอด , กลุ่มผสมตัวเองดอกตูมและดอกบาน 1 หลอด และกลุ่มผสมข้าม ดอกตูมและดอกบาน 1 หลอด เติม NaOH 1 N ให้ท่วมดอกในหลอด นำไปต้มในอ่างน้ำควบคุม อุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบนำออกมาตั้งที่ อุณหภูมิห้อง

5. การย้อมสี

นำส่วนของเกสรตัวเมียที่ผ่านการทำให้อ่อนนุ่มมาล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วเติม aniline blue 0.2 % ใน $K_3PO_4 . 3 H_2O$ 2 % ให้ท่วมดอก นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6. การทำสไลด์

นำส่วนของเกสรตัวเมียวางบนสไลด์ แล้วหยด glycerol 1 หยด ปิดด้วย cover slip แล้วกด (squash) ปิดขอบ cover slip ด้วยยาทาเล็บ

7. การบันทึกผล

นำสไลด์ที่เตรียมไปดูด้วยกล้องจุลทัศน์ใช้แสง fluorescence ความเข้มแสง 100 W ใช้ เลนซ์วัตถุ 10 X โดยบันทึกจำนวนของละอองเกสรตัวผู้ (pollen) ที่เจริญเป็นเปอร์เซนต์ เมื่อเทียบ กับจำนวนละอองเกสรตัวผู้บนยอดเกสรตัวเมีย

เกณฑ์การตัดสิน

1. ผสมตัวเองขณะดอกบานมีท่อละอองเกสรตัวผู้งอก 0 % = ผสมตัวเองไม่ติด
2. ผสมตัวเองขณะดอกบานมีท่อละอองเกสรตัวผู้งอก 30 % = ผสมตัวเองไม่ติด
3. ผสมตัวเองขณะดอกบานมีท่อละอองเกสรตัวผู้งอก 50 % = ผสมตัวเองไม่ติดปาน กลาง
4. ผสมตัวเองขณะดอกบานมีท่อละอองเกสรตัวผู้งอก 80 % = ผสมตัวเองติด
5. ผสมตัวเองขณะดอกบานมีท่อละอองเกสรตัวผู้งอก 100 % = ผสมตัวเองติด

การทดลองที่ 2 ผลของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ต่อการลบล้างลักษณะการผสมตัวเองไม่ติด

1. เพาะเมล็ดผักกาดขาวปลีเบอร์ 27 – 3 – 7 ลงในจานเพาะที่รองด้วยกระดาษเพาะเมล็ด รดน้ำ ผสมยากันราให้ชุ่ม เมื่อเมล็ดงอกนำเข้าตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 วัน เพื่อกระตุ้นให้เกิดตาดอก

2. ย้ายต้นกล้าที่ผ่านความเย็นแล้วมาปลูกลงในกล่องฟิล์มที่บรรจุดิน : ปุ๋ยคอก : ขี้เถ้าแกลบ อัตราส่วน 2 :1: 1 และผสมปุ๋ยออสโมโค้ท จำนวน 3-4 เม็ดต่อกล่องฟิล์ม

3. นำกล่องฟิมล์ที่เพาะต้นกล้าแล้วไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียสและให้แสงตลอดเวลา (รูปที่ 8) รดน้ำเช้าเย็นสลับกับการให้ธาตุอาหารสูตร Hoagland สัปดาห์ละ 2 ครั้ง (ดูวิธีการเตรียมในภาคผนวก)

4. หลังจากเพาะลงกล่องฟิล์มประมาณ 1 เดือนผักกาดขาวปลีจะเริ่มแทงช่อดอก ปล่อยให้ดอกบาน 3 วัน จึงทำการผสมตัวเอง ทั้งดอกตูมและดอกบาน โดยใช้เกสรจากต้นเดียวกัน แล้วทำเครื่องหมายด้วยการผูกเชือกระหว่างดอกตูมและดอกบาน พร้อมทั้งเขียนป้ายบอกรายละเอียดบอกจำนวนดอกตูมและดอกบานที่ทำการผสมและวันที่ผสม

5. ทำการฉีดพ่นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 0.0 , 0.5 , 1.5 , 3.0 , 4.5 เปอร์เซ็นต์ และ control (ไม่พ่น) หลังจากผสมเกสรไปแล้วประมาณ 1 ชั่วโมง

6.บันทึกการทดลองเมื่อเมล็ดเริ่มแก่โดยสังเกตจากเปลือกของฝักเริ่มเป็นสีเหลืองเก็บเกี่ยวและนำมาผึ่งไว้ในที่ร่มให้แห้ง แล้วแยกเมล็ดจากฝักที่เกิดจากการผสมดอกตูม และดอกบาน เพื่อคำนวณการติดเมล็ดดังต่อไปนี้

$$\text{จำนวนเมล็ด/ดอก} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมด}}{\text{จำนวนดอกที่ทำการผสม}}$$

$$\text{จำนวนเมล็ด/ฝัก} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมด}}{\text{จำนวนฝักที่ติดหลังการผสม}}$$

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) มี 3 ซ้ำต่อวิธีการ (5 ต้น ต่อ 1 ซ้ำ)

รูปที่ 8 ผักกาดขาวปลีที่เลี้ยงในห้องควบคุม

การทดลองที่ 3 การผสมข้ามแบบพบกันหมด

ตอนที่ 1 การผลิตเมล็ดลูกผสม

เพาะเมล็ดพันธุ์เบอร์ 23 – 3 – 1 , 27 และ 142 – 8 ลงในจานแก้ว (petridish) ที่รองด้วยกระดาษเพาะเมล็ดรดน้ำผสมยากันราให้ชุ่มเมื่อเมล็ดงอกนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน หลังจากนั้นนำมาย้ายลงปลูกในกล่องที่บรรจุดินผสมขี้เถ้าแกลบอัตราส่วน 2 : 1 ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว และผสมปุ๋ยออสโมโค้ท จำนวน 3 – 4 เม็ด ต่อ กล่อง

นำกล่องที่เพาะต้นกล้าพันธุ์ละ 24 ต้นวางเรียงกันบนแผ่นโฟมที่หุ้มด้วยผ้ารีลาเน่ เพื่อช่วยให้ต้นกล้าดูดน้ำจากถาดผ่านก้นกล่องฟิล์มได้ดี โดยมิให้รากเน่า จากนั้นนำไปเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และให้แสงตลอดเวลา รดน้ำเช้าเย็นสลับกับการให้ธาตุอาหารสูตร Hoagland สัปดาห์ละ 2 ครั้ง และพ่นยาฆ่าแมลงและยากันราสัปดาห์ละครั้ง

หลังจากเพาะประมาณ 20 วัน จะเริ่มแทงช่อดอกก็ทำการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ต่าง ๆ ดังตารางที่ 1 หลังผสม 1-2 สัปดาห์ ฝักจะเริ่มมีการพัฒนา รอจนฝักแห้งประมาณ 80 % จึงเก็บมาผึ่งไว้ เมื่อฝักแห้งสนิทจึงแกะเมล็ดใส่ถุงกระดาษ เขียนชื่อพันธุ์ แล้วใส่ถุงพลาสติกอีกชั้น นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อรอการการปลูกต่อไป

ตารางที่ 1 แสดงการผสมข้ามของฝักกาดขาวปลีสายพันธุ์ต่าง ๆ

สายพันธุ์แม่	สายพันธุ์พ่อ		
	23-3-1	27	142-8
23-3-1		x	x
27	x		X
142-8	x	x	

ตอนที่ 2 การเปรียบเทียบพันธุ์

นำเมล็ดลูกผสมที่ได้จากตอนที่ 1 ซึ่งได้แก่ 23 – 3 – 1 x 27 , 23 – 3 – 1 x 142 – 8 , 27 x 23 – 3 – 1 , 27 x 142 – 8 , 142 – 8 x 23 – 3 – 1 , 142 – 8 x 27 สายพันธุ์พ่อแม่ ได้แก่ 23 – 3 – 1 , 27 , 142 –8 และพันธุ์มาตรฐานได้แก่ ตราช้าง บอมปี 159 (ตราเครื่องบิน) มาเพาะในกระบะเพาะกล้า ซึ่งมีวัสดุเพาะ ที่มีส่วนผสมของดิน : ขี้เถ้าแกลบ : ปุ๋ยคอก อัตราส่วน 2 : 1 : 1 ตามลำดับ

เมื่อต้นกล้าอายุได้ประมาณ 30 วันย้ายลงปลูกในแปลงขนาด 1 x 2 เมตร ระยะปลูก 40x50 เซนติเมตร แปลงละ 10 ต้น รองก้นหลุมด้วยปุ๋ยสูตร 16–16–16 อัตรา 50 กิโลกรัม/ ไร่ และปุ๋ยคอกก่อนปลูก หลังจากย้ายกล้า 25 วัน ใส่ปุ๋ยสูตร 46–0–0 ในอัตรา 50 กิโลกรัม / ไร่ เก็บเกี่ยวเมื่ออายุได้ 45 วัน

การดูแลรักษา กำจัดวัชพืชและพ่นยาป้องกันกำจัดศัตรูพืชเป็นครั้งคราว

การบันทึกข้อมูล

1. น้ำหนักปลี
2. heterosis

2.1 เทียบกับพ่อแม่ที่สูงกว่า (better parent)

$$\text{heterosis}(\%) = \frac{\overline{F_1} - \overline{BP}}{\overline{BP}} \times 100$$

$\overline{F_1}$ = ผลผลิตเฉลี่ยของลูกผสม

$\overline{BP}$ = ผลผลิตเฉลี่ยของพ่อแม่ที่สูงกว่า

2.2 เทียบกับค่าเฉลี่ยของพ่อแม่ (mid parent)

$$\text{heterosis}(\%) = \frac{\overline{F_1} - \overline{MP}}{\overline{MP}}$$

$\overline{F_1}$ = ผลผลิตเฉลี่ยของลูกผสม

$\overline{MP}$ = ผลผลิตเฉลี่ยของพ่อแม่

3. ความกว้าง ยาวของปลี
4. ดรรชนีปลี = ความยาวของปลีเฉลี่ย /ความกว้างของปลีเฉลี่ย

5. ความแน่นของปลี (solidity) = MHW / ($0.524d_1^2d_2$)

MHW = น้ำหนักปลีเฉลี่ย

d_1 = ความกว้างของปลีเฉลี่ย

d_2 = ความยาวของปลีเฉลี่ย

6. ขนาดของลำต้น

7. ดรรชนีลำต้น = $\frac{\text{ความยาวของลำต้นเฉลี่ย}}{\text{ความกว้างของลำต้นเฉลี่ย}}$

8. สีของใบ

9. การเกิดโรค

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (randomized complete block design) มี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 6 ต้น

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

การทดลองที่ 4 การแยกลูกผสม ออกจากพ่อแม่โดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีส

1. การเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution)

1.1 Tris – buffer 0.1 M , pH 8.2

รวมสารละลายของ Tris (hydroxymethyl) aminomethane 0.1 M (12.1 กรัมในน้ำกลั่น 1,000 มล.) จำนวน 50 มล. เข้ากับสารละลายของ HCl 0.1 M (9.85 มล. ในน้ำกลั่น 1,000 มล.) จำนวน 21.9 มล. เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวมเป็น 200 มล.

เก็บในขวดสีชา อุณหภูมิ 4 – 10 องศาเซลเซียส

1.2 สารละลายเข้มข้น A , pH 8.9

นำ Tris – buffer 36.6 กรัมและ TEMED (N, N, N' , N' –tetramethylenediamine) 0.23 มล. ละลายในน้ำกลั่น 20 มล .ปรับ pH ให้ได้ 8.9 ด้วย HCl หรือ NaOH เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวมเป็น 100 มล.

เก็บในขวดสีชา อุณหภูมิ 4 – 10 องศาเซลเซียส

1.3 สารละลายเข้มข้น B , pH 6.7

นำ Tris – buffer 5.98 กรัม และ TEMED 0.46 มล. ละลายในน้ำกลั่น 20 มล. เติมกรดไฮโดรครอริกเข้มข้น 1 N จำนวน 48 มล. ปรับ pH ให้ได้ 6.7 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มล.

เก็บในขวดสีชา อุณหภูมิ 4 – 10 องศาเซลเซียส

1.4 สารละลายเข้มข้น C

ละลาย acrylamide 29.2 กรัม และ N, N'-methylene bis – acrylamide 0.8 กรัม ในน้ำกลั่น 20 มล . เติมน้ำให้ได้ปริมาตรรวมเป็น 100 มล. กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

เก็บในอุณหภูมิ 4 – 10 องศาเซลเซียส

1.5 สารละลายเข้มข้น D

ละลาย ammonium persulphate 0.1 กรัมในน้ำ 1 มล.

เก็บในอุณหภูมิ 4 – 10 องศาเซลเซียส มีอายุใช้งานไม่เกิน 7 วัน

1.6 สารละลายเข้มข้น electrode buffer

ละลาย Tris – buffer 6.0 กรัม และ glycine 28.8 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มล. ปรับ pH ให้ได้ 8.3 เติมน้ำให้ได้ปริมาณ 1,000 มล.

เก็บในขวดสีชา อุณหภูมิ 4 – 10 องศาเซลเซียส เมื่อจะใช้ให้เติมน้ำกลั่นไปอีก 10 เท่า

2. การสกัดโปรตีนอย่างหยาบ

นำต้นกล้าพันธุ์ 27 , 142-8 , 27x142-8 และ 142-8x27 เก็บในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อชงักการทำงานของเอนไซม์

นำต้นกล้าที่ผ่านการแช่แข็งหนัก 1.5 กรัม บดในโกร่งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (โกร่งเก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส) ค่อย ๆ เติม Tris – buffer 0.1 M pH 8.2 จำนวน 2.5 มล. จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10 ,000 รอบ ต่อนาที เป็นเวลานาน 30 นาที

3. การเตรียมเจล (vertical slab gel)

3.1 การเตรียมแผ่นกระจกสำหรับใส่เจล (gel mould)

นำแผ่นกระจกที่จะใช้เตรียมเจลซึ่งมี 2 แผ่น มาทำความสะอาดโดยการเช็ดด้วย acetone หรือ alcohol แล้วประกบกระจกตามความหนาที่ต้องการ โดยใช้ spacer ประกบแล้วตรึงแผ่นกระจกเข้ากับขาตั้ง (cast stand) วางบนแท่นเตรียมเจล (gel mould supporter)

3.2 การเตรียม running หรือ separating gel

ผสมสารละลายเข้มข้น	A	12.50 มิลลิลิตร
	C	16.65 มิลลิลิตร
	D	250 ไมโครลิตร
	TEMED	25 ไมโครลิตร
	น้ำ	20.10 มิลลิลิตร

คนให้เข้ากันนำไปเทลงใน gel mould ที่เตรียมไว้สูงประมาณ 12 ซม. ทำให้ผิวหน้าเรียบโดยหยอดน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าสูงประมาณ 1 ซม. ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1.5 – 2 ชั่วโมง แล้วเทน้ำกลั่นที่รักษาผิวหน้าเจลทิ้งให้หมดแล้วจึงหยอด stacking gel

3.3 การเตรียม stacking หรือ spacer gel

ผสมสารละลายเข้มข้น	B	5.0 มิลลิลิตร
	C	2.6 มิลลิลิตร
	D	100 ไมโครลิตร
	TEMED	20 ไมโครลิตร
	น้ำ	12.2 มิลลิลิตร

คนให้เข้ากัน เทลงในแผ่นกระจกที่เตรียม running gel สูงประมาณ 1 ซม. พร้อมกับเสียบหวี (comb) เพื่อกำหนดช่องว่างสำหรับหยอดตัวอย่างทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวนานประมาณ 1 ชั่วโมง จึงดึงหวีที่เสียบออก ล้างผิวหน้า เจล 4 – 5 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่น

4. การแยกแถบโปรตีน (protein banding separation)

นำส่วนบนของ chamber มาประกบกับแผ่นเจลที่เตรียมไว้เติม electrode buffer ลงในถังบรรจุสารละลายด้านบน และด้านล่างหยอดตัวอย่างที่สกัดไว้ลงในช่องว่างที่ดึงหวีออกแล้ว จำนวน 100 µl เติม bromophenol blue 0.02 % และซูโครสเข้มข้น 10 % ลงไป 1 – 2 หยด

เดินเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า 30 mA จนกระทั่งเห็นสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่เป็นเส้นตรงจึงเปลี่ยนกระแสไฟเป็น 250 โวลล์ และเมื่อสีของ bromophenol blue อยู่ห่างจากขอบล่างของเจลประมาณ 1 นิ้ว จึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ระหว่างที่มีการจ่ายกระแสไฟฟ้าควบคุมอุณหภูมิที่ 4 – 7 องศาเซลเซียส ตลอดเวลา โดยการควบคุมของเครื่องควบคุมอุณหภูมิน้ำเย็นหมุนเวียนเข้าออก

แกะแผ่นกระจก ตัดขอบล่างด้านซ้ายของแผ่นเจลเพื่อทราบลำดับหมายเลขตัวอย่างที่หยอดไป นำเจลแช่ในสารละลายที่ประกอบด้วย substrate , coengyme และ dye ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเอนไซม์ peroxidase , acid phosphatase และ esterase ในสภาพที่ไม่มีแสง ที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าเบา ๆ เพื่อเร่งปฏิกิริยาจนเห็นแถบสีคมชัดที่สุด

นำแผ่นเจลล้างน้ำไหลช้า ๆ ล้างจนพื้นเจลที่ไม่เกิดแถบสีใส แล้วนำมาแช่ในสารละลาย acetic acid 7 % ที่ผสม glycerol 10% เพื่อหยุดปฏิกิริยา และละลายสีส่วนเกินออก

5. ประเมินผล

5.1 บันทึกด้วยภาพ

วางแผ่นเจลบนแผ่นพลาสติกสีขาวขุ่นที่มีน้ำกลั่นหล่อไว้เล็กน้อยไม่ให้เจลแห้งขณะปฏิบัติงาน วางแผ่นพลาสติกลงบนโต๊ะที่มีหลอดไฟส่องขึ้นมาเพื่อให้เห็นแถบสีได้ชัดเจนขึ้น ตั้งกล้องบันทึกภาพที่คมชัดและเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างพันธุ์

5.2 การเขียน zymogrom

เขียนรูปแบบของแถบสีตามลำดับความเข้มที่ปรากฏให้เห็นประกอบกับค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) แต่ละแถบของเอนไซม์

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University