บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การสำรวจและศึกษาอาการโรคผลลายของลำไย

1.1 การสำรวจโรคผลลายของลำไย

ทำการสำรวจโรคผลลายของลำไย ในแหล่งปลูกลำไยของจังหวัด เชียงใหม่ ลำพูน และจันทบุรี โดยเฉพาะพื้นที่ที่เคยมีการระบาดรุนแรงมาก่อน เช่น สวนลำไยในอำเภอพร้าว สันทราย หางดง สันป่าตอง จอมทอง และฮอด จังหวัดเชียงใหม่ อำเภอเมือง แม่ทา ป่าซาง และลี้ จังหวัดลำพูน ส่วนจังหวัดจันทบุรี ที่อำเภอสอยดาว และโป่งน้ำร้อน เก็บตัวอย่างมาศึกษาลักษณะอาการ และแยกเชื้อสาเหตุต่อ

1.2 การศึกษาอาการผลลายของลำไย

ทำการบันทึกลักษณะอาการของโรคที่เกิดขึ้น บนผลลำไย ที่เกิดขึ้นขณะอยู่บนต้นในสภาพสวน จากนั้นเก็บตัวอย่างใส่ถุงพลาสติก จากแหล่งต่าง ๆ ที่มีการระบาดของโรค เพื่อนำมาวินิจฉัยและศึกษาหาเชื้อสาเหตุในห้องปฏิบัติการ

1.3 การแยกเชื้อราสาเหตุของโรคผลลาย

นำตัวอย่างลำไยที่เก็บมาจากสวนที่เกิดการระบาด มาแยกหาเชื้อสาเหตุโดยวิธีแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อที่เป็นโรค (tissue transplant) โดยตัดชิ้นพืชบริเวณขอบแผล (บริเวณกึ่งกลางของส่วนเนื้อเยื่อที่ปกติ และเป็นโรค) ให้ได้ขนาดประมาณ 3 X 3 มิลลิเมตร จากนั้นนำมาแช่ในแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 2-3 วินาที แล้วย้ายชิ้นพืชแช่ใน Clorox 10% เป็นเวลา 3-4 นาที จากนั้นย้ายลงในน้ำกลั่น 1 นาที แล้วซับด้วยกระดาษทิชชูที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำชิ้นพืชวางบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) จานละ 4 ชิ้นบ่มเชื้อ (incubation) ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 วันให้เชื้อราเจริญออกมาจากชิ้นพืชจากนั้นสะกิดปลายเส้นใยของแต่ละ colony ไปเลี้ยงบนอาหาร PDA จานใหม่เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ (pure culture)

เมื่อได้เชื้อราที่แยกจากอาการผลลายแล้ว นำเชื้อราต่าง ๆ ไปทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค เพื่อหาเชื้อราสาเหตุโรคที่แท้จริง โดยปลูกเชื้อ (inoculation) บนผลลำไยในแต่ละช่อ ก่อนทำการปลูกเชื้อพ่นด้วย alcohol 75% ลงบนผลลำไย ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำเชื้อราแต่ละเชื้อที่เจาะด้วย cock borror มาวางบนผลลำไย จากนั้นใช้กระดาษฟางที่ชุ่มน้ำ ห่อผลลำไยทั้งช่อ แล้วคลุมด้วยถุงพลาสติกเพื่อเป็น moist chamber ติดฉลาก (label) เชื้อรา 1 ชนิดต่อ 1 ช่อ (ภาพที่ 2-4) สังเกตลักษณะ

อาการ ช่อที่เป็นชุดควบคุม (control) วางด้วยชิ้นอาหาร PDA หลังจากนั้น 2 วันมาเปิดถุงพลาสติกดูอาการบนผลลำไย ถ้าพบลักษณะผลลายให้นำมาแยกเชื้ออีก (reisolation) เพื่อให้ทราบว่าเชื้อที่ปลูกสามารถทำให้เกิดโรค และเป็นเชื้อเดิม จากนั้นนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA และ sub culture เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ และเก็บไว้ใน slant เพื่อทำการทดลองต่อไป

ภาพที่ 2 การปลูกเชื้อโดยวางเชื้อ (inoculum disc) ลงบนผลลำไย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาพที่ 3 ห่อผลด้วยกระดาษฟางแล้วฉีดพ่นน้ำเพื่อให้ความชื้นแก่ช่อผลลำไยหลังการปลูกเชื้อ

ภาพที่ 4 ห่อผลด้วยถุงพลาสติกเพื่อรักษาความชื้นและติดฉลาก (label) เชื้อราแต่ละชนิด

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

2. การศึกษาปัจจัยที่ทำให้เกิดอาการผลลายของลำไย

ทำการทดลองในสภาพสวน กับลำไยที่ให้ผลผลิตในฤดู และนอกฤดู

แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลองคือ

การทดลองที่ 1 เป็นลำไยในฤดูเริ่มทดลอง วันที่ 1 มิถุนายน 2545 และเก็บเกี่ยวผลผลิต วันที่ 11 กรกฎาคม 2545

การทดลองที่ 2 เป็นลำไยนอกฤดูเริ่มทดลอง วันที่ 9 มิถุนายน 2545 และเก็บเกี่ยวผลผลิต วันที่ 22 มิถุนายน 2545

การทดลองที่ 3 เป็นลำไยนอกฤดูเริ่มทดลอง วันที่ 14 มิถุนายน 2545 และเก็บเกี่ยวผลผลิต วันที่ 12 สิงหาคม 2545

โดยฉีดพ่นสารชีวภาพ หรือสารกำจัดเชื้อราแต่ละกรรมวิธีบนช่อผลลำไย กรรมวิธีละ 1 ต้น ๆ ละ 10 ช่อผล พ่นสัปดาห์ละ 1 ครั้ง กรรมวิธีที่ทดลองมีทั้งหมด 22 กรรมวิธี (22 treatment) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

กรรมวิธีที่1 T1 = น้ำสกัดชีวภาพหอยเชอรี่ อัตรา 20 มล ต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 2 T2 = ซัคคารีน อัตรา 20 มล ต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 3 T3 = น้ำสกัดชีวภาพจากพืช อัตรา 20 มล ต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 4 T4 = โพลีซัคคาไรด์ อัตรา 20 มล ต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 5 T5 = บูมอัพ พลัส อัตรา 20 มล ต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 6 T6 = สารสกัดจากสาหร่ายทะเล อัตรา 30 มล ต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 7 T7 = สารอินทรีย์สกัด อัตรา 20 มล ต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 8 T8 = สารสกัดจากสาหร่ายธรรมชาติ อัตรา 20 มล ต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 9 T9 = ซัลเฟอร์ อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 10 T10 = น้ำ (control)

กรรมวิธีที่ 11 T11 = T1 + แมนโคเซบ อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 12 T12 = T2 + แมนโคเซบ อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 13 T13 = T3 + แมนโคเซบ อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 14 T14 = T4 + แมนโคเซบ อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 15 T15 = T5 + แมนโคเซบ อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 16 T16 = T6 + แมนโคเซบ อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 17 T17 = T7 + แมนโคเซบ อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 18 T18 = T8 + แมนโคเซบ อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 19 T19 = แมนโคเซบ อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 20 T20 = อะซ็อกซีสโตรบิน 25% เอส ซี อัตรา 10 มลต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 21 T21 = ไดฟีโนโคนาโซล 25% อี ซี อัตรา 10 มลต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 22 T22 = ไซโปรโคนาโซล 10% เอส เอล อัตรา 5 มลต่อน้ำ 20 ลิตร

แต่ละกรรมวิธี ผสมสารจับใบ และกำหนดจำนวนครั้งของการฉีดพ่นเพื่อความสม่ำเสมอในการทดลอง ฉีดพ่นตั้งแต่เริ่มติดผล จนถึงระยะเก็บเกี่ยว วัดขนาดของผล 2 ครั้งคือ ก่อนทำการฉีดพ่น และก่อนเก็บเกี่ยว สังเกตลักษณะอาการ สีผิวของผล และวัดขนาดผล ข้อมูลที่ได้จะนำไปวิเคราะห์ทางสถิติตามวิธี randomized complete-block design (one-way classification) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ได้ของแต่ละ treatment โดยวิธี Least Significant Difference test (LSD) อธิบายโดย Steel and Torries (1960)

สำหรับการทดลองที่ 1 มีทั้งหมด 4 กรรมวิธี คือ สารอินทรีย์สกัด สารสกัดจากสาหร่ายธรรมชาติ บูมอัพ พลัส และชุดควบคุม (control)

3.การทดสอบประสิทธิภาพของสารกำจัดเชื้อราในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุของโรคผลลายของลำไย

3.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารกำจัดเชื้อราในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุของโรคผลลายของลำไยในห้องปฏิบัติการ

3.1.1 สารกำจัดเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุของโรคผลลายของลำไย

สารกำจัดเชื้อราที่ใช้ในการทดลองมี 13 ชนิด (treatment) ดังนี้ คือ benomyl 50%WP, mancozeb 80%WP, difenoconazole 25%EC, azoxystrobin 25%SC, carbendazim 50%WP, carbendazim 50%F, carbendazim 50%WP + benomyl 50%WP, procymidone 50%WP, fosetyl aluminium 80%WP, iprovalicarb + propineb 66.8%WP, propineb 70%WP, tebuconazole 25%EW และ cyproconazole 10%SL อัตราที่ใช้ของสารกำจัดเชื้อราแต่ละชนิด ตามคำแนะนำของผู้ผลิต (ปริมาณสารกำจัดเชื้อราที่ใช้แสดงไว้ในตารางที่ 1)

3.1.2 การผสมอาหาร PDA กับสารกำจัดเชื้อรา (อาหารพิษ)

ในการเตรียม stock solution ของสารกำจัดเชื้อราที่ใช้นั้น เตรียมใน flask โดยชั่งสารกำจัดเชื้อราแต่ละชนิดตามปริมาณที่คำนวณได้ (ตารางที่ 1) ไปผสมกับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 100 มิลลิลิตร แล้วดูด solution ของสารกำจัดเชื้อราแต่ละชนิด ๆ ละ 10 มิลลิลิตร ไปผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เตรียมไว้แล้ว 150 มิลลิตร ต่อ 1 flask (ทำในตู้ถ่ายเชื้อ) เขย่า flask ให้อาหารผสมกับสารกำจัดเชื้อราแล้วจึงนำไปเทในจานอาหาร โดย 1 flask เทให้ได้ 10 จาน ซึ่งได้ปริมาตรจานละ 16 มิลลิลิตร ทำจนครบทุกสารกำจัดเชื้อรา (treatment) ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ

ตารางที่ 1 ปริมาณสารกำจัดเชื้อราชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร PDA (อาหารพิษ)

สารกำจัดเชื้อรา	อัตราที่ใช้ (น้ำ 20 ลิตร)	ปริมาณสารออกฤทธิ์ (ppm.)	ปริมาณสารสารกำจัดเชื้อรา (น้ำ 20 ลิตร)
Benomyl 50%WP	40 กรัม	1000	0.2 กรัม
Mancozeb 80%WP	40 กรัม	1600	0.2 กรัม
Difenoconazole 25%EC	20 มล	250	0.1 มล
Azoxystrobin 25%SC	10 มล	125	0.05 มล
Carbendazim 50%WP	10 กรัม	250	0.05 กรัม
Carbendazim 50%F	20 มล	500	0.1 มล
Procymidone 50% WP	10 กรัม	250	0.05 กรัม
Fosetyl aluminium 80%WP	30 กรัม	1200	0.15 กรัม
Iprovalicarb + propineb 66.8% WP	15 กรัม	501	0.075 กรัม
Propineb 70%WP	30 กรัม	1050	0.15 กรัม
Tebuconazole 25%EW	20 มล	250	0.1 มล
Cyproconazole 10%LS	5 มล	25	0.025 มล

3.1.3 การปลูกเชื้อลงบนอาหาร เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสารกำจัดเชื้อรา

หลังจากเตรียมอาหารพิษและเทลงในจานอาหาร เมื่ออาหารแข็งตัวแล้ว ใช้ cock boror ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะตรงปลายเส้นใยของเชื้อรา unknown 5 และเชื้อรา isolate จากจันทบุรี ที่เลี้ยงไว้เกือบเต็มจานอาหาร PDA จากนั้นนำไปวางบนจานอาหารพิษที่เตรียมไว้ แล้วนำไปบ่ม (incubation) ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจวัดและบันทึกผลการทดลอง โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ colony ของเชื้อหลังจากปลูกเชื้อทุก ๆ วัน จนกระทั่งเชื้อที่ปลูกในอาหาร PDA ที่ไม่ผสมสารเคมีใด ๆ (treatment control) เจริญจนเกือบเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติโดยตามวิธี randomized complete-block design (one-way classification) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ได้ของแต่ละ treatment โดยวิธี Least Significant Difference test (LSD) อธิบายโดย Steel and Torries (1960)

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารกำจัดเชื้อราในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุของโรคผลลายของลำไยในสภาพสวน

นำสารกำจัดเชื้อราที่ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคผลลายในห้องปฏิบัติการแล้วพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญได้ดี มาทดสอบประสิทธิภาพในสภาพสวนลำไยของเกษตรกร ที่อำเภอโป่งน้ำร้อน จังหวัดจันทบุรี พื้นที่ประมาณ 4 ไร่ มีจำนวนต้นลำไยทั้งหมดประมาณ 333 ต้น ระยะปลูก 5 x 4 เมตร ซึ่งก่อนทำการทดลองเจ้าของสวนได้ฉีดพ่น mancozeb (40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร) ผสม benomyl (10 กรัม/น้ำ 20 ลิตร) ไปแล้ว เมื่อวันที่ 27 มีนาคม 2546 หลังจากนั้นได้วางแผนการทดลอง โดยฉีดพ่นสารกำจัดเชื้อราแต่ละกรรมวิธี ๆ ละ 4 ต้น พ่นสัปดาห์ละครั้ง กรรมวิธีที่ทดลองมีทั้งหมด 5 กรรมวิธี (5 treatment) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 T1 = prochloraz (20 มิลลิลิตร) ผสม mancozeb (40 กรัม) ต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 2 T2 = benomyl (10 กรัม) ผสม mancozeb (40 กรัม) ต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 3 T3 = procymidone (20 กรัม) ผสม mancozeb (40 กรัม) ต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 4 T4 = thiophanate-methyl (20 กรัม) ผสม mancozeb (40 กรัม) ต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 5 T5 = น้ำ (control)

4.การเปรียบเทียบเชื้อราสาเหตุโรคผลลายของลำไยกับเชื้อราอื่นซึ่งมีลักษณะเส้นใยคล้ายกันและทำให้เกิดโรคกับพืชชนิดอื่น

4.1 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคจากพืชชนิดอื่น

จากการศึกษาเบื้องต้นทราบว่าเชื้อที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายกับเชื้อราซึ่งเป็นสาเหตุโรคผลลาย (แยกได้จาก 1.3) คือเชื้อราที่แยกได้จากโรคผลเน่าของมะม่วง ฝรั่ง และโรคใบไหม้ของลำไย โดยทำการแยกเชื้อโดยวิธีแยกจากเนื้อเยื่อที่เป็น โรค (tissue transplant) วิธีการเดียวกันกับข้อ 1.3

4.2 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับลำไย

นำเชื้อทั้ง 5 ชนิด คือ เชื้อราจากโรคผลเน่าของมะม่วง ฝรั่ง 2 isolate โรคใบไหม้ของลำไย และเชื้อ *Rhizoctonia solani* จากโรคกาบใบแห้งของข้าว มาทดสอบปลูกเชื้อบนผลลำไย โดยวิธีการเดียวกับข้อ 1.3 เพื่อให้ทราบว่าเชื้อจากแหล่งดังกล่าวจะทำให้เกิดโรคกับลำไยหรือไม่ จากนั้นนำเชื้อราที่เกิดโรคกับลำไยไปศึกษาต่อ

4.3 การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของเชื้อรา

นำเชื้อราจากข้อ 4.2 ที่พบว่าสามารถทำให้เกิดโรคผลลายกับลำไย มาเปรียบเทียบความสัมพันธ์กับเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคผลลาย โดยการเปรียบเทียบแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ คือ ลักษณะทางสันฐานวิทยา (morphology) และ ลักษณะทางชีวโมเลกุล (biochemical)

4.3.1 การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology)

นำเชื้อราที่ต้องการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์แล้ว (pure culture) มาเลี้ยงบนอาหาร PDA แล้วตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope เพื่อสังเกตลักษณะของโคโลนี สี ลักษณะการเจริญ ตลอดจนลักษณะของเส้นใย และสปอร์ของเชื้อรา จากนั้นใช้เข็มเขี่ยปลอดเชื้อ เขี่ยเอาเส้นใยของเชื้อราวางบนสไลด์ที่หยด lactophenol ปิดด้วย cover slips แล้วนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope เพื่อเปรียบเทียบลักษณะของเส้นใยแต่ละชนิด

4.3.2 การเปรียบเทียบลักษณะทางชีวเคมี (biochemical)

การเปรียบเทียบลักษณะทางชีวเคมี โดยใช้วิธีการเปรียบเทียบแบบแผนของไอโซไซม์ (isozyme) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

การเตรียมเส้นใยเชื้อรา

นำเชื้อราที่ต้องการเปรียบเทียบเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มเชื้อ(incubate) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน แล้วใช้ cork boror ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะบริเวณขอบของ โคโลนี แล้วย้ายชิ้นวุ้นเลี้ยงในอาหาร PDB (Potato Dextrose Broth) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 4 วัน แล้วนำมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อหลาย ๆ ครั้ง รอจนเส้นใยแห้งดี

การสกัด เอนไซม์ของเชื้อรา

ใช้วิธีการซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Ozeki (1983) ดังนี้ ชั่งเส้นใยของเชื้อรา 500 มิลลิกรัม ใส่ลงในโกร่งเซ่เย็นจัด (-4 องศาเซลเซียส) แล้วเติม Phosphate buffer 0.1 M pH 7.5 (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ง) 3 มิลลิลิตร บดให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเทของเหลวใสที่ได้ใส่ในหลอดทดลอง (micro-centrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นแยกของเหลวใสที่อยู่ด้านบนใส่ในหลอดทดลองใหม่ (vial tube) เขย่าให้เข้ากัน เก็บแช่เย็งไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาสเซลเซียส เพื่อนำไปทำ polyacrylamide gel electrophoresis

การเตรียม slab gel

1. ต่อชุดแผ่นกระจก สำหรับเตรียม gel หนา 1.6 เซนติเมตร โดยใช้ spacer เป็นตัวปรับความหนาของ gel ให้หนา 1.0 มิลลิเมตร คำนวณปริมาณของ gel ที่จะใช้ โดยที่จะใส่ stacking gel (upper gel) ให้มีความสูงประมาณ 2 เซนติเมตร เหนือ separating gel (lower gel)

2. เตรียมสารละลายของ gel 10% (separating gel) ที่ยังไม่ได้ polymerlize โดยผสมสารต่าง ๆ (ตารางที่ 2) ให้เข้ากัน ยกเว้น APS และ TEMED ซึ่งจะใส่หลังดูดอากาศออก โดยใช้ปั๊มประมาณ 10 นาที

ตารางที่ 2 ส่วนผสมสำหรับ SDS-PAGE Separating and Stacking Gels

Monomer Concentration (%T, 2.67%C)	Separating Gel (.375M Tris, pH 8.8)	Stacking Gel (.125M Tris, pH 6.8)
Acrylamide/bis (30% T, 2.67%C Stock)	16.65 ml	1.3 ml
Distilled water	20.1 ml	6.1 ml
1.5 M Tris-Hcl, pH 8.8	12.5 ml	-
0.5 M Tris-Hcl, pH 6.8	-	2.5 ml
10% ammonium persulfate (APS)(fresh)	250 µl	50 µl
TEMED	25 µl	µl

3. ค่อย ๆ ผสม APS และ TEMED ลงในสารละลาย gel ที่ดูดอากาศออกแล้ว เทสารละลาย gel ใส่ลงระหว่างแผ่นแก้วที่เตรียมไว้ จากนั้นค่อย ๆ หยดน้ำกลั่นให้คลุมผิว gel เพื่อให้ผิวหน้าของ gel เรียบ ทิ้งไว้ให้ gel แข็งตัว ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 30 นาที เมื่อ gel แข็งตัว

4. เตรียมสารละลาย stacking gel 7.5% จำนวน 5 มิลลิลิตร โดยผสมสารตามส่วนผสมที่แสดงในตารางในภาคผนวกเข้าด้วยกัน ดูดอากาศออกจากสารละลายโดยใช้ปั๊ม ประมาณ 10 นาที

5. ค่อย ๆ เทน้ำออกจากแผ่นกระจก ใส่ comb ลงไป

6. ใส่ APS 10% จำนวน 50 µl และ TEMED 10 µl ใน 10 ml ของ stacking gel ที่ดูดอากาศออกแล้ว ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงบน separating gel ที่เตรียมไว้ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศเกิด หลังจากเจลแห้งแล้วให้ดึง comb ออกช้า ๆ

การทำอิเล็กโตรโฟรีซีส

1. ต่อชุดอิเล็กโตรโฟรีซีสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม running buffer ลงใน chamber

2. ใส่ตัวอย่างเอนไซม์ที่ผสม sample buffer ที่สกัดได้ อัตรา 100:5 ไมโครลิตร ลงในช่องบน stacking gel โดยใช้เข็มสำหรับ loading ค่อย ๆ หยอดผ่าน buffer ลงในช่อง gel

3. ต่อขั้วบวกเข้ากับ chamber ล่าง และขั้วลบเข้ากับ chamber บน และเปิดสวิทช์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยใช้กระแสที่ 20 มิลลิแอมแปร์ ประมาณ 30 นาที 40 แอมแปร์ จนกระทั่งสีของ bromophenol blue จะเคลื่อนที่มาถึงปลายล่างของ gel

4. นำแผ่นแก้วออกจาก chamber และนำแผ่น gel ที่อยู่ระหว่างแผ่นแก้วออกมาวางบน plate เพื่อย้อมเอนไซม์ต่อไป

การย้อมเอนไซม์ใน gel

เตรียม staining solution ของ esterase isozyme ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ตรวจพบได้ง่าย และมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่คงที่ ไม่แปรผันเหมือนเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ (Nakagahra *et al.*, 1975) (รายละเอียดดูในภาคผนวก ง) เทลงบนกล่องพลาสติก ที่มี gel อยู่ นำไปบ่มในที่มืดไว้ประมาณ 15-60 นาที จนปรากฏแถบสีชัดเจน

การบันทึกข้อมูล

นำ gel ที่ย้อมสีแล้วมาศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ จากตำแหน่ง จำนวน ขนาด และนำค่าการมีแถบสี และไม่มีแถบสีมาวิเคราะห์กลุ่ม ตามสมการต่อไปนี้

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

5. สถานที่ดำเนินงานวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. ห้องปฏิบัติการภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการ โครงการ การควบคุมโรคและแมลงศัตรูที่สำคัญของลำไย คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล จังหวัดลำปาง
4. แปลงทดลองปลูกไม้ผล (ลำไย) สาขาไม้ผล ภาควิชาผลิตกรรมเกษตร ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยแม่โจ้
5. สวนลำไยของเกษตรกร อำเภอฮอด จังหวัดเชียงใหม่
6. สวนลำไยของเกษตรกร อำเภอโป่งน้ำร้อน จังหวัดจันทบุรี

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University