บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 วัสดุ

1.1.1 พืชทดลอง

1.1.1.1 กิ่งพันธุ์ดี อะติโมย่าพันธุ์แอฟริกันไพรด์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น 0.25 – 0.30 เซนติเมตร มีใบติด 3 - 4 ใบ

1.1.1.2 ต้นตอน้อยหน่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น 0.25 – 0.30 เซนติเมตร มี 9 ชนิด คือ น้อยโหน่ง ทุเรียนน้ำ น้อยหน่าอะเมซอน น้อยหน่าครั่ง อะติโมย่า น้อยหน่าฝ้าย น้อยหน่าหนัง น้อยหน่าหนังทอง เชอริโมย่า

1.2 สารเคมี

1.2.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับวิเคราะห์อิเล็กโทรโฟรีซิส

1.2.1.1 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของสารสกัด (extraction buffer)ได้แก่ 0.2 M Tris-HCl buffer pH 8.4, PVP-40

1.2.1.2 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของเจล ได้แก่ acrylamide stock solution, 0.1 M Tris-HCl pH 8.8, ammonium persulphate, TEMED

1.2.1.3 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ electrode buffer ได้แก่ Tris (HCl) aminomethane, glycine

1.2.1.4 สารเคมีที่ใช้ย้อมเอนไซม์ แอซิคฟอสฟาเทส (ACP) ได้แก่ 0.5 M sodium acetate buffer pH 5.0, fast garnet GBC, disodium α - napthyl phosphate

1.2.1.5 สารเคมีที่ใช้ย้อมเอนไซม์ เอสเตอเรส (EST) ได้แก่ 0.2 M phosphate buffer pH 6.0, fast blue B salt, α - napthyl acetate, absolute ethanol

1.2.1.6 สารเคมีที่ใช้ย้อมเอนไซม์ เพอร์ออกซิเดส (POX) ได้แก่ 0.1 M Tris buffer pH 4.0, 3-amino-9-ethylcarbazole, β-napthol, acetone, hydrogen peroxide

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.2 สารเคมีสำหรับตัดเนื้อเยื่อวิทยาพืชโดยวิธีของ Johansen (1968) และ Sass (1966)

1.2.2.1 FAA (formalin-acetic acid-alcohol) (ภาคผนวก)

1.2.2.2 กลีเซอรีน (glycerol)

1.2.2.3 เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และน้ำกลั่น โดยใช้ ส่วนผสมในอัตราที่แตกต่างกัน 4 ระดับ 50 70 85 และ 95 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก)

1.2.2.4 น้ำยาสำหรับทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing reagent) ได้แก่ ไซลีน (xylene) และ cover oil

1.2.2.5 น้ำยายึดเนื้อเยื่อพืชให้ติดแผ่นสไลด์ สารเหนียวของเตรียมสารละลาย เข้มข้น (ภาคผนวก)

1.2.2.6 สีย้อมซาฟรานินโอ (safranin O) และฟาสท์กรีน (fast green) (ภาคผนวก)

1.2.2.7 ตัวกลางสำหรับปิดแผ่นสไลด์ คือ Canada balsam

1.3 อุปกรณ์

1.3.1 อุปกรณ์สำหรับการศึกษาสัณฐานวิทยา

- เครื่องชั่งอย่างละเอียดแบบทศนิยมสองตำแหน่ง
- เวอร์เนียคาลิเปอร์
- เครื่องมือวัดพื้นที่ใบ (Portable Leaf Area Meter รุ่น Cl-202)
- ไม้บรรทัด

1.3.2 อุปกรณ์สำหรับการศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส

- เครื่องชั่งอย่างละเอียดแบบทศนิยมสี่ตำแหน่ง
- เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)
- เครื่องหมุนเหวี่ยงตัวอย่างชนิดควบคุมอุณหภูมิได้
- ตู้เย็น และตู้เย็นแบบควบคุมอุณหภูมิต่ำที่ –20 องศาเซลเซียส
- ชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส Mini-protein ®II (Bio-Rad)
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า รุ่น POWER PAC 1000 (Bio-Rad)
- โกร่งบด
- ไมโครปิเปตชนิดที่สามารถปรับปริมาตรได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- หลอดใส่สารขนาด 1.5 มิลลิลิตร (eppendrof tube)
- หลอดใส่สารปรับปริมาตรขนาด 100 ไมโครลิตร
- หลอดหยด micropipette และ yellow tips
- ถุงพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่างและยางรัด
- กระติกน้ำแข็ง

1.3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

- เครื่องตัดเนื้อเยื่อพืชแบบเลื่อน ไถล (sliding microtome)
- ใบมีด (microtome knife)
- กระจกสไลด์และกระจกปิดสไลด์
- ขวดสำหรับใส่ชิ้นส่วนพืชและจานแก้วสำหรับย้อมสีสไลด์
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- พู่กัน ปากคีบ
- กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

2. วิธีการ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบรูณ์ (Completely Randomized Design; CRD) มี 5 ซ้ำ (ซ้ำละ 5 ต้น) มี 9 หน่วยทดลอง (สายพันธุ์) โดยเพาะเมล็ดพันธุ์ต้นตอแต่ละชนิดลงถุงพลาสติกขนาด 6x12 นิ้ว ดูแลต้นกล้าในสถานเพาะชำเมื่อต้นกล้าอายุ 6-12 เดือน นำกิ่งอะติโมย่าพันธุ์แอฟริกันไพรด์อายุ 1 ปี มาทำต่อกิ่งแบบเสียบลิ่มกับต้นตอทั้ง 9 ชนิด (ภาพที่ 2)

ภาพที่ 1 ขั้นตอนในการต่อกิ่งอะติโมย่าพันธุ์แอฟริกันไพรด์บนต้นตอน้อยหน่าชนิดต่างกัน

การศึกษาความเข้ากันได้ของต้นตอและกิ่งพันธุ์ดี ซึ่งการศึกษาครั้งนี้แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง คือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 1 แบบแผนไอโซไซม์ของอะติโมย่าพันธุ์แอฟริกันไพรด์บนต้นตอน้อยหน่าชนิดต่างกัน ดัดแปลงตามวิธีการของ Huang *et al.*(1984) ; Pascual *et al*. (1993) และ Gulen *et al*. (2005) วิธีการมีดังนี้

1. การเตรียมตัวอย่างพืช

นำเนื้อเยื่อรอยต่อของพืชทดลองที่ผ่านการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20° ซ มาทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น และเช็ดให้แห้ง นำมาชั่ง 3 กรัม หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในโกร่งที่เย็นจัด บด ตัวอย่างให้ละเอียด ใส่ PVP- 40 0.05 กรัม และ extraction buffer 3 มล. นำไปแยกส่วนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 2° ซ นาน 20 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใส (supernatant) ใส่ในหลอดทดลองอันใหม่ นำมาเข้าเครื่องเหวี่ยงอีกครั้ง แล้วจึงดูดส่วนที่เป็นของเหลวใสที่ได้ใส่ไว้ในหลอดทดลองอันใหม่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20° ซ เมื่อจะทำการวิเคราะห์ จึงผสมส่วนที่เป็นของเหลวใส กับ marker dye ในอัตราส่วน 9 :1 เขย่าให้เข้ากัน

2. การเตรียมเจล

ประกอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส ใส่ เจลที่เตรียมไว้ ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อรอให้เจลเกิด polymerization จึงดึงหวีเสียบ (comb) ออก จะเห็นเป็นช่อง

3. การประกอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส

ประกอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสเติม electrode buffer ลงใน chamber

4. นำตัวอย่างที่ผสม marker dye แล้ว หยอดลงบนเจลแต่ละช่อง ช่องละหนึ่งตัวอย่าง ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อช่อง ระวังอย่าให้ตัวอย่างฟุ้งกระจาย

5. การผ่านกระแสไฟฟ้า

ปิดฝาครอบแล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟ ตั้งค่ากระแสคงที่ 20 มิลลิแอมแปร์ แล้วดำเนินการผ่านกระแส โดยควบคุมค่าความต่างศักย์ไม่ควรเกิน 250 โวลต์ และควบคุมอุณหภูมิที่ 4° ซ ตัวอย่างที่มี marker ก็จะเคลื่อนที่ลงมา จนระดับของ marker อยู่ห่างจากขอบล่างของแผ่นเจลประมาณ 1 ซม จึงหยุดกระแสไฟฟ้านำแผ่นกระจกออกจาก chamber แล้วแกะแผ่นเจลออกจากแผ่นกระจก ตัดมุมของเจลเพื่อทำเป็นเครื่องหมาย แล้วนำมาวางบนจานแก้ว (plate) เพื่อย้อมสีเอนไซม์ต่อไป

6. การย้อมสีเอนไซม์

นำเจลที่ได้มาย้อมด้วย staining solution ของไอโซไซม์ชนิดต่างกัน รอจนเกิดแถบสี แล้วล้างสีส่วนเกินออก

7. การบันทึกผลและวิเคราะห์ข้อมูล

นำเจลที่เกิดแถบสีมาบันทึกค่าระยะทางของ marker dye ตำแหน่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8. คำนวณหาค่าระยะทางการเคลื่อนที่ (ตำแหน่ง)

จากการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility; Rm) แล้ววาดแผนภาพ zymogram ของไอโซไซม์ดังกล่าว

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rm.)} = \frac{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของแถบสี}}{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของ marker dye}}$$

การทดลองที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของของอะติโมย่าพันธุ์แอฟริกันไพรด์บนต้นตอน้อยหน่าชนิดต่างกัน

ทำการศึกษาการเจริญเติบโตของอะติโมย่าพันธุ์แอฟริกันไพรด์บนต้นตอน้อยหน่าชนิดต่างกัน วัดข้อมูลการเจริญเติบโตหลังเสียบยอดจนถึง 48 สัปดาห์ วัดข้อมูลการเจริญเติบโตดังนี้ ความสูง (วัดจากขอบบนของรอยต่อถึงปลายยอด) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นเหนือและใต้รอยต่อ (วัดห่างจากรอยต่อ 1 เซนติเมตร) จำนวนกิ่ง (นับกิ่งที่แตกใหม่และมีใบแล้ว) จำนวนใบ (นับใบที่แตกใหม่สามารถสังเคราะห์แสงได้) พื้นที่ใบ ความยาวรากวัดผลสัปดาห์ที่ 48 หลังต่อกิ่ง น้ำหนักแห้ง (ลำต้น+ ใบ) และราก และหาสัดส่วนน้ำหนักแห้งต้นต่อราก

การทดลองที่ 3 ลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ของอะติโมย่าพันธุ์แอฟริกันไพรด์บนต้นตอน้อยหน่าชนิดต่างกัน มีวิธีการดังนี้

1. การคัดเลือกเก็บชิ้นส่วนพืช (collection of plant material)

เก็บชิ้นส่วนรอยต่อต้นของอะติโมย่าพันธุ์แอฟริกันไพรด์ที่การต่อกิ่งบนต้นตอน้อยหน่าทั้ง 9 ชนิด

2. การฆ่าเซลล์และรักษาสภาพเซลล์ (killing and fixing)

แช่ในขวดแก้วที่บรรจุ FAA 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำขวดดังกล่าวไปใส่ใน เครื่องดูดอากาศเพื่อไล่ฟองอากาศออกจากเนื้อเยื่อก่อน หลังจากนั้นนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนานอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปผ่านขั้นตอนต่อไป

3. การตัดชิ้นส่วนพืช (sectioning)

ด้วยเครื่องตัดแบบเลื่อนไถล นำชิ้นส่วนของพืชติดกับแท่นยึดตั้งความหนาประมาณ 8-12 ไมครอน

4. การย้อมสีการดึงน้ำออกจากเซลล์ (staining and dehydration)

ล้างด้วย เอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. ทำการย้อมสีซาฟรานินโอ ใช้เวลา 12-24 ชม. จากนั้นทำการดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วยเอทานอล โดยตัดเนื้อเยื่อแช่ในเอทานอล 50 70 80 และ 95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ละขั้นจะแช่ 3 - 5 นาที แล้วนำไปย้อมสีฟาสท์กรีนใช้เวลาย้อมประมาณ 5- 10 วินาที ล้างสีติดมากเกินไปโดย cove oil 3 - 5 นาที แช่เนื้อเยื่อในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 3 - 5 นาที แช่เนื้อเยื่อในเอทานเอลบริสุทธิ์ 3 - 5 นาที แช่เนื้อเยื่อในเอทานเอลบริสุทธิ์กับไซลีน (อัตราส่วน 1:1) และ แช่ในเนื้อเยื่อในไซลีน 2 ครั้งๆ ละ 30 นาที

6. การปิดแผ่นสไลด์ (mounting)

ยึดเนื้อเยื่อพืชให้ติดแผ่นสไลด์ โดยสารเหนียวของฮอพท์ แล้วปิดแผ่นสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์โดยใช้ Canada balsam ยึด เมื่อแผ่นสไลด์แห้งสนิท นำแผ่นสไลด์ไปศึกษาเนื้อเยื่อใต้กล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพ

สถานที่ดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. แปลงเพาะชำสถานีเกษตรหลวงปางดะ มูลนิธิโครงการหลวง อ. สะเมิง จ. เชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

เริ่มตั้งแต่เดือนกันยายน 2547 – เดือนกุมภาพันธ์ 2550

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved