บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

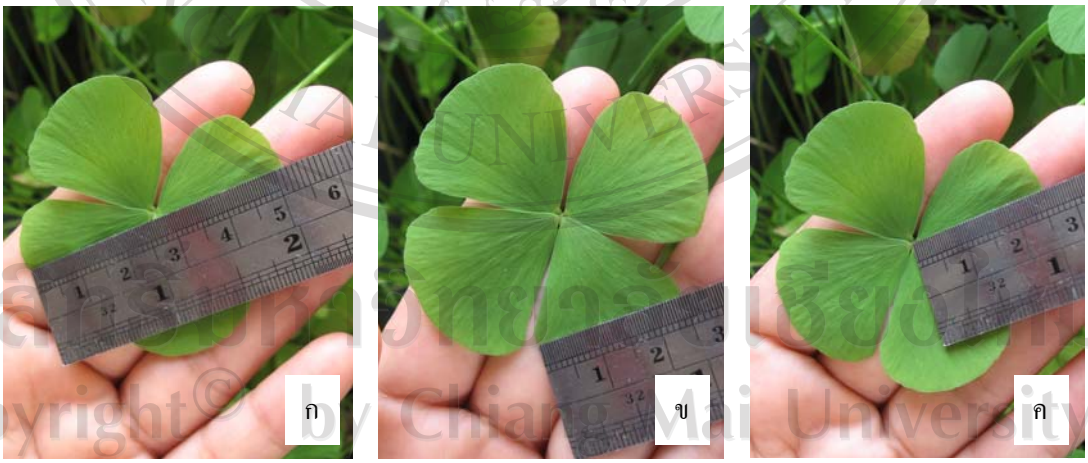
การทดลองที่ 1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

รวบรวมพันธุ์ผักแว่นจาก 4 ภาค คือ ภาคเหนือ 4 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ตาก และอุตรดิตถ์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดขอนแก่น สกลนคร และอุบลราชธานี ภาคกลาง จำนวน 2 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดนครนายก และสุพรรณบุรี และภาคตะวันออก 1 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดชลบุรี รวม 10 แหล่ง

ศึกษาสัณฐานวิทยาโดยปลูกต้นพืชทดลอง โดยใช้ส่วนยอดถึงข้อที่ 3 ในกะละมังขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้ว บันทึกพืชทดลองในระยะที่เจริญเติบโตเต็มที่ แหล่งละ 5 ต้น ดังนี้

1.1 ลำต้น วัดความยาวของต้นจากยอดถึงข้อสุดท้าย ความยาวของต้นจากยอดถึงข้อที่ 4 และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นระหว่างข้อที่ 3 และ4

1.2 ใบ ใช้ใบข้อที่ 3 วัดเส้นผ่านศูนย์กลางใบประกอบโดยวัดกลางปลายใบย่อยมายังกลางปลายใบย่อยอีกใบ ที่อยู่ในระนาบเดียวกัน วัดความกว้างใบย่อยจากขอบใบด้านหนึ่งมายังขอบใบอีกด้านหนึ่งที่ตำแหน่งกว้างที่สุด วัดความยาวใบย่อยโดยวัดจากฐานใบถึงปลายใบ (ภาพที่ 1) และวัดความยาวก้านใบ



ภาพที่ 5 วิธีการวัดข้อมูลใบ

ก = การวัดเส้นผ่านศูนย์กลางใบประกอบ ข = การวัดความกว้างใบย่อย

ค = การวัดความยาวใบย่อย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 การศึกษากายวิภาควิทยา

ศึกษาจากเนื้อเยื่อที่ตัดตามยาวและตามขวางของราก ลำต้น ใบ และก้านใบ โดยใช้วิธี paraffin embedding ของ Johansen (1940)

ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อการศึกษาทางกายวิภาค มีดังนี้

2.1 ตัดชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อที่ต้องการศึกษา โดยแช่ในน้ำยา FAA (formalin-acetic-acid-alcohol) (ภาคผนวก ก) เพื่อหยุดการทำงานของเซลล์และรักษาสภาพเซลล์

2.2 ดึงน้ำออกจากเซลล์ของเนื้อเยื่อ ด้วยน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ทั้ง 5 ชนิด (ภาคผนวก ก) จากนั้นนำเนื้อเยื่อแช่ใน 100% TBA นาน 24 ชั่วโมง ตามด้วยน้ำยาที่มีส่วนผสมของ TBA และพาราฟินเหลว ในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.3 ถ่ายเนื้อเยื่อลงไปในขวดแก้วที่บรรจุพาราฟินที่หลอมแล้ว นำไปเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 56 องศาเซลเซียส เพื่อให้พาราฟินซึมไปในเนื้อเยื่อ นานประมาณ 1 สัปดาห์

2.4 นำเนื้อเยื่อมาฝังในพาราฟิน จัดตำแหน่งของเนื้อเยื่อให้อยู่ในตำแหน่ง และระนาบที่ต้องการ

2.5 นำแท่งพาราฟินที่ได้มาตัดแต่งให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมโดยให้ชิ้นส่วนพืชอยู่ตรงกลาง แล้วนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุน โดยทำการตัดตามยาว หรือตามขวาง ให้มีความหนาประมาณ 13-15 ไมครอน

2.6 นำแถบชิ้นส่วนพืช ที่ตัดออกมาติดลงบนแผ่นกระจกสไลด์ โดยใช้ albumin (ภาคผนวก ก) เป็นตัวยึดติดกับสไลด์ วางสไลด์บนเครื่องอุ่นสไลด์จนแถบชิ้นส่วนพืชแห้ง และติดกับแผ่นสไลด์

2.7 นำแผ่นกระจกสไลด์ไปละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อ และทำความสะอาดเนื้อเยื่อโดยใช้ xylene แล้วย้อมสีด้วย Delafield's hematoxylin (ภาคผนวก ก) ปิดแผ่นกระจกปิดสไลด์โดยใช้ Canada balsam เป็นตัวยึด

2.8 นำแผ่นกระจกสไลด์ไปศึกษาเนื้อเยื่อ ใต้กล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 3 การศึกษาจำนวนโครโมโซม

ศึกษาจำนวนโครโมโซมของผักแว่น 10 แหล่ง โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Feulgen and Rossenback ที่มีชื่อว่า Feulgen squash method(ภูวดล, 2528; Dyer, 1979) โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.1 เตรียมรากพืช โดยใช้รากที่งอกใหม่บริเวณปลายยอด ตัดมาเฉพาะส่วนปลายที่มีความยาวประมาณ 3-5 มิลลิเมตร

3.2 หยุดวงชีพเซลล์ โดยแช่รากในสารละลาย para-dichlorobenzene (PDB)(ภาคผนวก ข) ที่อิ่มตัวในน้ำเป็นเวลานาน 60 นาที

3.3 นำปลายรากที่แช่ในสารละลาย PDB ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ (ภาคผนวก ข) นาน 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น

3.4 แยกเซลล์โดยแช่รากใน 1 N HCl (ภาคผนวก ข) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น

3.5 ย้อมสีเนื้อเยื่อปลายรากใน carbol fuchsin (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 60 นาที

3.6 นำปลายรากที่ผ่านการย้อมสีแล้ววางบนแผ่นกระจกสไลด์ ขยี้ปลายรากด้วยเข็มเขี่ยหยดสี carbol fuchsin 1 หยด ตรงบริเวณปลายราก ใช้เข็มเขี่ยเคาะเนื้อเยื่อเพื่อให้เซลล์กระจาย คีบเนื้อเยื่อส่วนเกินทิ้ง แล้วปิดแผ่นกระจกปิดสไลด์บนบริเวณที่มีเนื้อเยื่อ วางกระดาษซับบนแผ่นกระจกสไลด์ แล้วกดนิ้วหัวแม่มือลงไป เพื่อให้เซลล์กระจาย และซับสีส่วนเกินออก

3.7 นำแผ่นกระจกสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมตาเฟส และเป็นเซลล์ที่มีการกระจายตัวของโครโมโซม สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้ แล้วบันทึกภาพใต้กล้องจุลทรรศน์

การทดลองที่ 4 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์

ศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของผักแว่นจาก 10 จังหวัด โดยใช้เทคนิคโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส ศึกษากับเอนไซม์ 3 ชนิด คือ acid phosphatase (ACP), esterase (EST) และ peroxidase (POX) เพื่อนำไปหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของผักแว่นทั้ง 10 จังหวัด โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมตัวอย่างพืชและการสกัด นำใบข้อที่สามนับจากยอด ของผักแว่นจากแปลงปลูก ล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด เช็ดให้แห้ง ชั่งใบให้ได้น้ำหนัก 0.5 กรัม แล้วนำมาบดในโกร่งที่แช่เย็นจัด จนตัวอย่างละเอียด เติมน้ำยาสกัดเอนไซม์ (ภาคผนวก ค) 3 มิลลิลิตร และ polyvinyl-polyrrolidone (PVPP) 0.5 กรัม บดจนตัวอย่างเข้ากัน บรรจุสารละลายที่ได้ลงใน eppendorf tube แล้วนำไปแยกส่วนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ดูดเอาส่วนที่เป็นของเหลวใส นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง แล้วจึงดูดส่วนที่เป็นของเหลวใส่ใน eppendorf tube เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำโพลิอคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิสต่อไป

2. การทำโพลิอคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส ประกอบชุดกระจกสำหรับทำ slab gel เข้าด้วยกัน จากนั้นเตรียมสารละลาย separating gel (ภาคผนวก ค) แล้วนำสารละลายเจลเทลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ระหว่างแผ่นกระจกพร้อมเสียบหวี ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัว จากนั้นดึงหวีเสียบออก จะเห็นเป็นช่อง สำหรับหยอดตัวอย่างที่ผสม marker dye แล้ว จากนั้นประกอบชุดอิเล็คโทรโฟรีซิสเข้าด้วยกัน เติม electrode buffer ลงใน chamber หยอดตัวอย่างที่ผสมกับ marker dye ในอัตราส่วน 9 : 1 ลงในช่องเจล ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ระวังอย่าให้ตัวอย่างฟุ้งกระจาย ต่อขั้วบวกและขั้วลบเข้ากับ chamber เปิดสวิตซ์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยใช้กระแสไฟ 20 มิลลิแอมแปร์ ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟ เมื่อระดับของ marker dye อยู่ห่างจากขอบล่างของแผ่นเจล ประมาณ 1 นิ้ว จากนั้นนำแผ่นกระจกออกจาก chamber ทำเครื่องหมายให้ทราบจุดเริ่มต้น ค่อย ๆ แกะเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นกระจกออกมาวางในกล่องพลาสติก เพื่อย้อมสีเอนไซม์ต่อไป

3. นำเจลที่ได้มาย้อมด้วยสีย้อมเอนไซม์ 3 ชนิด คือ ACP, EST และ POX (ภาคผนวก ค) เทลงในกล่องพลาสติกที่มีเจลอยู่ เก็บในที่มืด เขย่าเจลเป็นระยะ ๆ รอจนเกิดแถบสี จากนั้นล้างเจลให้สะอาด แล้วแช่เจลในกรดแอซิตริกเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ เพื่อรักษาสภาพเจล

4. นำเจลที่เกิดแถบสีแล้วมาบันทึกการเคลื่อนที่ของ marker dye และแถบสี บันทึกตำแหน่ง ขนาด จำนวนแถบสี และรูปแบบการเกิดแถบสีของไอโซไซม์แต่ละชนิด ถ่ายภาพเจล และคำนวณค่าระยะทางการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) เพื่อนำไปเขียนแผนภาพไซโมแกรม โดย

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพัทธ์} = \frac{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของแถบสี}}{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของ marker dye}}$$

5. การวิเคราะห์กลุ่มพืช กำหนดให้ตัวอย่างพืชเป็น operational taxonomic unit (OUT) และแถบสีเป็นลักษณะ (character) ใช้การมีแถบสีและไม่มีแถบสีมาวิเคราะห์ โดยให้ค่าการมีแถบสีเป็น 1 และค่าไม่มีแถบสีเป็น 0 นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์กลุ่มพืช (cluster analysis) ของไอโซไซม์นั้นด้วย UPGMA cluster analysis ตามวิธีการของ Jaccard's similarity coefficient โดยใช้โปรแกรม SPSS

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 5 การผลิตผักแว่นโดยใช้วัสดุปลูกที่ไม่ใช้ดิน

แบ่งออกเป็น 4 การทดลองย่อย ดังนี้

5.1 การศึกษาผลของแหล่งที่มาต่อการเติบโต ในระบบสารละลายไหลผ่าน

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 4 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ต้น ดังนี้ กรรมวิธีที่ 1 ผักแว่นจากจังหวัดตาก กรรมวิธีที่ 2 ผักแว่นจากจังหวัดสกลนคร กรรมวิธีที่ 3 ผักแว่นจากจังหวัดสุพรรณบุรี และกรรมวิธีที่ 4 ผักแว่นจากจังหวัดชลบุรี

ปลูกผักแว่น 1 กรรมวิธีต่อ 1 รางปลูก โดยใช้กรวดยึดต้นที่เริ่มปลูกที่มีความยาวจากยอดถึงข้อที่ 3 ยาว 8-10 เซนติเมตร โดยใช้สารละลายธาตุอาหารสูตร CMU-RPF (ภาคผนวก ง)ให้ไหลผ่านรางปลูก ติดตั้งปั๊มน้ำเพื่อนำสารละลายธาตุอาหารหมุนเวียนกลับมาใช้ตลอดเวลา เติมสารละลายธาตุอาหารในถังบรรจุสารละลายที่มีปั๊มน้ำให้ได้ระดับ 20 ลิตร และเติมเพิ่มเพื่อให้ระบบดำเนินต่อไปอย่างต่อเนื่อง ทำการทดลองภายในโรงเรือนที่มีอุณหภูมิเฉลี่ย 29 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 56 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มแสง 3,260 ลักซ์

บันทึกความยาวต้นจากปลายยอดถึงข้อสุดท้าย เส้นผ่านศูนย์ใบประกอบ ความกว้างใบย่อย ความยาวใบย่อย และความยาวก้านใบ โดยใช้วิธีเช่นเดียวกับในการทดลองที่ 1 (1.2)

การทดลองที่ 5.2 การศึกษาผลของวัสดุยึดต่อการเติบโต ในระบบสารละลายหมุนเวียน

เลือกผักแว่นจากกรรมวิธีที่ดีที่สุดในการทดลองที่ 5.1 คือ กรรมวิธีที่ 1 ผักแว่นจากจังหวัดตาก ปลูกในวัสดุยึด 4 ชนิด โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มี 4 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ต้น ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ใช้หินกรวดเป็นวัสดุยึด

กรรมวิธีที่ 2 ใช้อิฐมอญทุบเป็นวัสดุยึด

กรรมวิธีที่ 3 ใช้ก้อนดินเผาทรงกลมเป็นวัสดุยึด

กรรมวิธีที่ 4 ใช้ก้อนดินเผาทรงสี่เหลี่ยมเป็นวัสดุยึด

ปลูกผักแว่นที่มีความยาวจากยอดถึงข้อที่ 3 ยาว 8-10 เซนติเมตร (ซม.) ปลูกในตะกร้าขนาด 7x10 นิ้ว ที่บรรจุวัสดุดังกล่าวข้างต้น สูง ครึ่งหนึ่งของความสูงของตะกร้า ปลูกให้ส่วนไหลอยู่ลึกลงไปในวัสดุยึด 2 ซม. โดยวางตะกร้าในถาดดำขนาด 1x1.5 เมตร สูง 10 ซม. ที่ติดตั้งปั๊มน้ำเพื่อให้สารละลายธาตุอาหารสูตร CMU-RPF หมุนเวียนตลอดเวลา โดยให้สารละลายท่วมสูง 7-8 ซม. โดยเริ่มให้สารละลายธาตุอาหาร ภายหลังจากปลูก 5 วัน ทำการทดลองภายใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โรงเรือนที่มีอุณหภูมิเฉลี่ย 30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 55 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มแสง 3,180 ลักซ์

บันทึกผลการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 5.1

การทดลองที่ 5.3 การศึกษาผลของวัสดุยึดต่อการเติบโตในระบบปลูกในภาชนะทรงกลม

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มี 4 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ต้น ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ใช้หินกรวดเป็นวัสดุยึด

กรรมวิธีที่ 2 ใช้อิฐมอญทุบเป็นวัสดุยึด

กรรมวิธีที่ 3 ใช้ก้อนดินเผาทรงกลมเป็นวัสดุยึด

กรรมวิธีที่ 4 ใช้ก้อนดินเผาทรงสี่เหลี่ยมเป็นวัสดุยึด

นำผักแว่นของจังหวัดตากที่มีความยาวจากยอดถึงข้อที่ 3 ยาว 8-10 ซม. ปลูกในภาชนะทรงกลมขนาด 9 นิ้ว ที่บรรจุวัสดุยึดครึ่งหนึ่งของภาชนะ ปลูกให้ส่วนไหลอยู่ลึกลงไปในวัสดุยึด 1.5 ซม. แล้วเติมน้ำประปาจนเต็มภาชนะที่ใช้ปลูก ให้สารละลายน้ำปุ๋ย สูตร CMU-RPF ภายหลังจากปลูก 5 วัน และคอยเติมให้อยู่ในระดับขอบภาชนะ ทำการทดลองภายในโรงเรือนที่มีความเข้มแสงเฉลี่ย 3,161 ลักซ์ อุณหภูมิเฉลี่ย 28.8 องศาเซลเซียส

บันทึกข้อมูลเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 (1.2)

การทดลองที่ 5.4 การศึกษาเปรียบเทียบการปลูกผักแว่นในวัสดุปลูกที่ไม่ใช้ดิน

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มี 4 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ต้น ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ใช้ขุยมะพร้าว : แกลบ : ทราย อัตราส่วน 6 : 3 : 1 เป็นวัสดุปลูก

กรรมวิธีที่ 2 ใช้ขุยมะพร้าว : แกลบ อัตราส่วน 1 : 1 เป็นวัสดุปลูก

กรรมวิธีที่ 3 ใช้ขุยมะพร้าวเป็นวัสดุปลูก

กรรมวิธีที่ 4 ใช้ถ่านแกลบเป็นวัสดุปลูก

เตรียมโต๊ะปลูกโดยใช้กระสอบปุ๋ยปูบนพื้นโต๊ะ 1 ชั้น แล้ววางก้อนอิฐมอญให้เป็นช่องขนาด 30 x100 ซม แล้วบรรจุวัสดุปลูก และทำการให้สารละลายปุ๋ยสูตร CMU-RPF โดยใช้บัวรดน้ำรดในปริมาณ 3 ลิตรต่อช่อง ปลูกโดยใช้ไหลผักแว่นของจังหวัดตากที่มีความยาวจากยอดถึงข้อที่ 3 ยาว 8-12 เซนติเมตร ปลูกให้ส่วนไหลอยู่ลึกลงไปในวัสดุปลูกประมาณ 1.5 ซม เริ่มให้สารละลายน้ำปุ๋ย สูตร CMU-RPF (ภาคผนวก ง) ภายหลังจากวันปลูก 5 วัน โดยทำการให้วันละครั้ง ทดลองภายในโรงเรือนที่มีอุณหภูมิเฉลี่ย 31 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มแสงเฉลี่ย 2,525 ลักซ์ ข้อมูลเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 (1.2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สถานที่ทำการวิจัย ห้องปฏิบัติการทางสรีรวิทยา ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

โรงเรือนเพาะชำ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

เริ่มวิจัยในเดือน มิ.ย. 2548 และสิ้นสุดการวิจัยในเดือน มิ.ย. 2551

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved