บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การปรับปรุงพันธุ์งาที่ผ่านการฉายรังสีด้วยวิธีการเพิ่มชุดโครโมโซม โดยศึกษาลักษณะของงาที่แปลงทดลองภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ แบ่งออกเป็น 4 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 การปลูกเปรียบเทียบสายพันธุ์งา การทดลองที่ 2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารละลายโคลชิซิน การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของสารละลายโคลชิซินโดยศึกษาลักษณะทางเซลล์วิทยา และรูปแบบไอโซไซม์ และการทดลองที่ 4 การปลูกประเมินสายพันธุ์งาที่ได้รับการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซม

อุปกรณ์และวิธีการทดลองมีดังต่อไปนี้

การทดลองที่ 1 การปลูกเปรียบเทียบสายพันธุ์งา

1.1 วัสดุ

1.1.1 พืชทดลอง เมล็ดพันธุ์งาจำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ n_5c_0, n_5c_1, n_5c_2, n_6d_0, n_6d_1, n_6d_2, n_6d_3, n_7c_0, n_7c_1 และสายพันธุ์ n_7c_2 ที่คัดเลือกมาจากข้อมูลพื้นฐานจาก ทิวา (2546) ซึ่งพิจารณาจาก การแตกกิ่งแขนง ความสูงข้อแรกที่ให้ดอก ความสูงต้น สีกลีบดอก และสีกลีบดอกด้านล่าง

1.1.2 วัสดุปลูก ได้แก่ ดิน: เปลือกถั่ว: ปุ๋ยคอก ในอัตรา 1: 1: 1

1.2 อุปกรณ์

1.2.1 ถุงพลาสติกเพาะสีดำ ขนาด 10×20 นิ้ว จำนวน 75 ถุง

1.2.2 สายยางรดน้ำ

1.2.3 ถาดเพาะ ช้อนปลูก แผ่นป้าย (tag) ลวด

1.2.4 ไม้บรรทัด ไม้วัดความสูง

1.2.5 พลาสติกคลุมแปลงสีดำ-เทา

1.2.6 แผ่นเทียบสี Munsell Limit Color Cascade ของบริษัท Munsell Color, USA

1.2.7 ตู้อบ (hot air oven)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.8 กล้องถ่ายภาพดิจิตอล

1.3 วิธีการทดลอง

1.3.1 เพาะเมล็ดงาทั้ง 10 สายพันธุ์ ในถาดเพาะ พบว่ามี 5 สายพันธุ์ที่ให้จำนวนต้นกล้ามากกว่า 20 ต้น จึงนำต้นกล้าของงาทั้ง 5 สายพันธุ์มาย้ายปลูกในถุงดำขนาด 10 × 20 นิ้ว ที่บรรจุวัสดุเพาะได้แก่ เปลือกถั่ว ปุ๋ยคอก ดิน

1.3.2 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design ; CRD) รวม 5 กรรมวิธี โดยแต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ต้น

กรรมวิธีที่ 1 เมล็ดงาสายพันธุ์ n_5c_0 (N1)

กรรมวิธีที่ 2 เมล็ดงาสายพันธุ์ n_5c_1 (N2)

กรรมวิธีที่ 3 เมล็ดงาสายพันธุ์ n_6d_0 (N3)

กรรมวิธีที่ 4 เมล็ดงาสายพันธุ์ n_6d_3 (N4)

กรรมวิธีที่ 5 เมล็ดงาสายพันธุ์ n_7c_0 (N5)

1.4 การบันทึกผลการทดลอง

1.4.1 จำนวนต้นกล้าที่งอก

1.4.2 ลักษณะการแตกกิ่ง

1.4.3 จำนวนกิ่งต่อต้น

1.4.4 ระยะเวลาในการให้ดอกแรก (ตั้งแต่เริ่มเพาะเมล็ดจนถึงดอกแรกบาน)

1.4.5 ช่วงเวลาการให้ดอก (ตั้งแต่ดอกแรกเริ่มบานจนถึงดอกสุดท้ายบาน)

1.4.6 ความสูงของลำต้นข้อแรกที่ให้ดอก วัดจากโคนต้นถึงข้อแรกที่ให้ดอก

1.4.7 ความสูงต้นเฉลี่ย วัดจากโคนต้นถึงปลายยอด

1.4.8 สีกลีบดอกบน และสีกลีบดอกด้านล่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารละลายโคลชิซิน

2.1 วัสดุ

2.1.1 วัสดุพันธุ์พืช เมล็ดพันธุ์งาที่คัดเลือกได้จากปลูกเปรียบเทียบพันธุ์ จากการทดลองที่ 1 จำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ N_1S_1, N_1S_2, N_1S_3, N_1S_4, N_2S_5, N_2S_6, N_2S_7, N_2S_8, N_2S_9 และ สายพันธุ์ N_3S_{10}

2.1.2 วัสดุปลูก ได้แก่ ดิน : เปลือกถั่ว : ปุ๋ยคอก ในอัตรา 1 : 1 : 1

2.2 สารเคมี

2.2.1 โคลชิซิน 0.5 เปอร์เซ็นต์ w/w

2.2.2 ลาโนลิน 20 กรัม

2.3 อุปกรณ์

2.3.1 ถุงพลาสติกเพาะสีดำ ขนาด 10×20 นิ้ว จำนวน 200 ถุง

2.3.2 พลาสติกคลุมแปลงสีดำ – เทา

2.3.3 สายยางรดน้ำ

2.3.4 จอบ ช้อนปลูก แผ่นป้าย

2.3.5 ไม้บรรทัดยาว ไม้วัดความสูง

2.3.6 ตู้อบ

2.3.7 แผ่นเทียบสี Munsell Limit Color Cascade ของบริษัท Munsell Color, USA.

2.3.8 เครื่องชั่งชนิดละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.3.9 บีกเกอร์ ขนาด 50 และ 100 มิลลิลิตร

2.3.10 ช้อนตักสาร แท่งแก้วสำหรับคนสารละลาย น้ำกลั่นขวดสีชา

2.3.11 กล้องถ่ายภาพดิจิตอล

2.4 วิธีการทดลอง

2.4.1 คัดเลือกสายพันธุ์งาจากสายพันธุ์ N1-N5 ที่มีศักยภาพในการใช้เป็นไม้ดอกไม้ประดับ และทำการผสมเกสรแบบผสมด้วยมือ ทำการควบคุมการถ่ายละอองเกสร (control pollination) โดย ใช้ถุงกระดาษไขคลุมดอกในต้นที่มีลักษณะที่ต้องการ ต้นละ 15 ดอก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.2 เก็บเมล็ดพันธุ์งา จากนั้นนำฝักงาใส่ถุงกระดาษเข้าตู้อบ อุณหภูมิ 60 – 70 องศาเซลเซียส นาน 24 - 48 ชั่วโมง

2.4.3 วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD มี 2 ซ้ำ ๆ ละ 10 ต้น มี 2 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 ไม่ได้รับสารโคลชิซิน (c_0)

กรรมวิธีที่ 2 ได้รับสารโคลชิซิน (c_1)

2.4.4 การเตรียมต้นพืช โดยการเพาะเมล็ดงาทั้ง 10 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ N_1S_1, N_1S_2, N_1S_3, N_1S_4, N_2S_5, N_2S_6, N_2S_7, N_2S_8, N_2S_9 และ สายพันธุ์ N_3S_{10} ในถาดเพาะ จากนั้นย้ายปลูกในถุงดำขนาด 10×20 นิ้ว ถุงละ 1 ต้น เมื่องางอกได้อายุประมาณ 2 สัปดาห์ หรือเมื่อต้นกล้างามีใบจริงคู่แรก จึงป้ายด้วยสารโคลชิซิน ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ w/w ในทุกๆ 5 วัน เป็นระยะเวลา 1 เดือน

2.5 การบันทึกผลการทดลอง

2.5.1 ลักษณะการแตกกิ่ง

2.5.2 ระยะเวลาในการให้ดอก (ตั้งแต่เริ่มเพาะเมล็ดจนถึงดอกบาน)

2.5.3 ช่วงเวลาการให้ดอกแรก (ตั้งแต่ดอกแรกจนถึงดอกสุดท้ายบาน)

2.5.4 ความสูงของลำต้นข้อแรกที่ให้ดอก วัดจากโคนต้นถึงข้อแรกที่ออกดอก

2.5.5 ความสูงต้นเฉลี่ย วัดจากโคนต้นถึงปลายยอด

2.5.6 สีกลีบดอกบน และสีกลีบดอกด้านล่าง

การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของสารละลายโคลชิซิน

การศึกษาผลของสารละลายโคลชิซิน กับพืชทดลองแบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อย โดยมีอุปกรณ์และวิธีการดังนี้

การทดลองที่ 3.1 การศึกษาเซลล์วิทยา

ศึกษาโครโมโซมจากเนื้อเยื่อปลายรากของพืชทดลองด้วยวิธี Feulgen's squash ที่ดัดแปลงโดยดวงทิพย์ (2539) และ ประภัสสร (2543)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.1 วัสดุ

3.1.1.1 ปลายรากของพืชทดลอง (งา) ที่ได้จากการทดลองที่

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับหยุดวงชีพเซลล์ (pre-treatment) ได้แก่ para-dichlorobenzene (PDB)

3.1.2.2 สารเคมีที่ใช้เตรียมน้ำยาในการรักษาสภาพเซลล์ (fixtative) คือ 95% ethyl alcohol และ glacial acetic acid ในอัตราส่วน 3 : 1

3.1.2.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับย่อยแยกเซลล์ (hydrolytic solution) คือ กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 1 นอร์มอล (N)

3.1.2.4 สีที่ใช้ย้อมโครโมโซม คือ carbol fuchsin

3.1.3 อุปกรณ์

3.1.3.1 ขวดแก้วขนาดเล็กสำหรับเก็บตัวอย่างราก

3.1.3.2 แผ่นกระจกสไลด์ และแผ่นกระจกปิดสไลด์

3.1.3.3 ปรอทวัดความร้อน

3.1.3.4 อ่างควบคุมอุณหภูมิ

3.1.3.5 อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ ปากคีบ เข็มเขี่ย กระบอกตวงสารเคมี และน้ำยาเคลือบเล็บ

3.1.3.6 กล้องจุลทรรศน์ชนิด Compound microscope และ Photomicroscope

3.1.4 วิธีการ

3.1.4.1 เก็บปลายรากของต้นพืชที่เพาะเมล็ดไว้สายพันธุ์ละ 100 เมล็ด ซึ่งเก็บเมล็ดรวมกันทุกต้น ในแต่ละกรรมวิธี จำนวน 2 ซ้ำ โดยเลือกจากรากที่กำลังเจริญเติบโตซึ่งบริเวณปลายรากมีสีขาวขุ่น ใช้ปลายรากที่งอกใหม่และมีความยาว 0.5 เซนติเมตร ตัดมาเฉพาะส่วนปลายเพียง 1-2 มิลลิเมตร เก็บตัวอย่างปลายรากในช่วงเวลา 08.30-09.30 นาฬิกา

3.1.4.2 นำปลายรากที่เลือกไว้ใส่ในขวดแก้วใสเล็ก โดยแช่ปลายรากในสารละลาย PDB เพื่อหยุดวงชีพเซลล์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 15 – 18 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.4.3 นำปลายรากออกมาจากสารละลาย PDB ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์นาน 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น

3.1.4.4 ย่อยเซลล์ให้แยกจากกันโดยการแช่รากใน 1 N HCl นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น

3.1.4.5 ย้อมเนื้อเยื่อปลายรากใน carbol fuchsin แช่ไว้นาน 1 คืน (24 ชั่วโมง) หลังจากนั้นคีบเนื้อเยื่อวางบนแผ่นกระจกสไลด์แล้วใช้มีดผ่าตัดตัดเฉพาะส่วนปลายรากให้ยาว 1 มิลลิเมตร เขี่ยส่วนเกินทิ้งไป หยดสี 1 หยดตรงบริเวณปลายราก ใช้เข็มเขี่ยเคาะเนื้อเยื่อเบาๆ เพื่อให้เซลล์กระจาย คีบเนื้อเยื่อส่วนเกินทิ้งแล้วปิดแผ่นกระจกปิดสไลด์บนบริเวณที่มีเนื้อเยื่อวางกระดาษซับบนแผ่นกระจกสไลด์เพื่อซับสีที่มากเกินไปออก กดนิ้วหัวแม่มือลงไปเพื่อให้เซลล์กระจาย

3.1.4.6 นำแผ่นกระจกสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมตาเฟสและมีการกระจายตัวของโครโมโซมดี สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้แม่นยำ เมื่อได้เซลล์ที่ต้องการแล้วกดแผ่นกระจกปิดสไลด์เบาๆ เพื่อให้เซลล์แบน และอยู่ในระนาบเดียวกัน ใช้น้ำยาเคลือบเล็บทาบริเวณขอบแผ่นกระจกปิดสไลด์เพื่อป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อแห้ง นำแผ่นกระจกสไลด์ไปตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อนับจำนวนโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้วบันทึกภาพตามความเป็นจริง

การทดลองที่ 3.2 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์

การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของพืชทดลองแบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อย โดยมีอุปกรณ์และวิธีการดังนี้

การทดลองที่ 3.2.1 การศึกษาวิธีการสกัดเอนไซม์

โดยศึกษาจากใบและใช้ชนิดของสารสกัด (extraction buffer) ไอโซไซม์ จากส่วนของใบงา จำนวน 3 สูตรได้แก่ สูตรที่ 1 Tris – buffer 0.2 M pH 8.4 ของ Kuntapanom and Smitamana (1997) สูตรที่ 2 Phosphate buffer pH 7.5 ของ Harsh (2003) และสูตรที่ 3 Diaz and Layrisse buffer ของ Diaz and Layrisse (2002)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.1.1 วัสดุ

3.2.1.1.1 ใบงา สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ และปลูกทดลองในการทดลองที่ 3.1

3.2.1.2 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ extraction buffer คือ

3.2.1.2.1 0.2 M Tris-HCl pH 8.4

3.2.1.2.2 0.1 M KH_2PO_4 pH 7.5

3.2.1.2.3 0.1 M K_2HPO_4 pH 7.5

3.2.1.2.4 5 % PVP 10

3.2.1.2.5 0.1 % mercaptoethanol

3.2.1.2.6 19 mM citric acid

3.2.1.2.7 0.9 % 2- mercaptoethanol

3.2.1.2.8 3 % albumin (ABS)

3.2.1.2.9 151 mM Tris

3.2.1.2.10 3 % polyvinyl pyrrolidone (3 % PVPP)

3.2.1.2.11 3 % polyethelene glycol

3.2.1.3 อุปกรณ์

3.2.1.3.1 ตู้แช่แข็งที่ปรับอุณหภูมิเป็น -20 องศาเซลเซียส และตู้เย็น

3.2.1.3.2 เครื่องหมุนเหวี่ยงสารชนิดควบคุมความเย็นได้ (refrigerated centrifuge)

3.2.1.3.3 เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.2.1.3.4 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย (pH meter)

3.2.1.3.5 โกร่งบดตัวอย่างพืช

3.2.1.3.6 ไมโครปิเปต

3.2.1.3.7 หลอดใส่สาร (eppendrof tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.2.1.3.8 เครื่องแก้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.1.4 วิธีการ

การสกัดสารจากใบงาของสูตรสารสกัดทั้ง 3 สูตรโดยนำใบงาจากส่วนบนของต้นมาทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น แล้วเช็ดให้แห้ง ชั่งใบให้ได้น้ำหนัก 1.0 กรัม หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในโกร่งที่แช่เย็นจัด แล้วบดตัวอย่างจนละเอียด โดยสูตรที่1 เติม extraction buffer 3 มิลลิลิตร และเติม PVPP 0.05 กรัม ต่อ 1 ตัวอย่าง สำหรับสูตรที่ 2 และสูตรที่ 3 ใช้ใบงา 0.5 กรัม และเติม extraction buffer 1.5 มิลลิลิตร แล้วบดจนตัวอย่างละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เทสารของเหลวที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใส ใส่หลอดทดลองอันใหม่ แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส ต่อไป

การทดลองที่ 3.2.2 ศึกษารูปแบบไอโซไซม์

โดยศึกษาจากใบและใช้เอนไซม์ 5 ชนิด คือ EST โดยดัดแปลงวิธีการศึกษาจากวิธีของรัติกาล (2543), POX, ACP โดยดัดแปลงวิธีการศึกษาจากวิธีของพสุ (2546), IDH และ SKD โดยดัดแปลงวิธีการศึกษาจากวิธีของ Diaz and Layrisse (2002)

3.2.2.1 สารเคมี

3.2.2.1.1 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ gel

3.2.2.1.1.1 30 % acrylamide stock solution (acrylation 29.2 กรัม และ bis-acrylamide 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาณ 100 มิลลิกรัม เก็บไว้ในขวดสีชาที่ 4 องศาเซลเซียส)

3.2.2.1.1.2 1.5 M Tris-HCl pH 8.8

3.2.2.1.1.3 10 % ammonium persulfate (APS) เตรียมทันทีก่อนใช้ (เตรียมโดยชั่งสาร 0.1 กรัม ผสมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร)

3.2.2.1.1.4 TEMED (N,N,N',N' – tetramethyl ethylene-diamine)

3.2.2.1.1.5 น้ำกลั่น

3.2.2.1.2 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ sample buffer

3.2.2.1.2.1 50 % glycerol

3.2.2.1.2.2 0.5 % bromophenol blue

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2.1.3 สารเคมีที่ใช้เป็น running buffer

3.2.2.1.3.1 Tris

3.2.2.1.3.2 Glycine pH 8.3 ต่อน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

3.2.2.1.4 สารเคมีที่ใช้ย้อมเอนไซม์

3.2.2.1.4.1 0.2 M phosphate buffer pH 6.0

3.2.2.1.4.2 fast blue B - salt

3.2.2.1.4.3 α - naphthyl acetate

3.2.2.1.4.4 3-amino-9-ethylcarbazole

3.2.2.1.4.5 β-naphthol

3.2.2.1.4.6 0.1 M Tris-HCl pH 4.0

3.2.2.1.4.7 3 % H_2O_2

3.2.2.1.4.8 0.05 % diaminobenzidine

3.2.2.1.4.9 0.05 % H_2O_2

3.2.2.1.4.10 0.05 M phosphate buffer pH 7.0

3.2.2.1.4.11 0.1 M acetate buffer pH 4.8

3.2.2.1.4.12 fast ganet GBC disodium salt

3.2.2.1.4.13 disodium α - naphthyl phosphate

3.2.2.1.4.14 0.5 M acetate buffer pH 4.8

3.2.2.1.4.15 α-naphthyl acid phosphate

3.2.2.1.4.16 10 % $MgCl_2$

3.2.2.1.4.17 0.2 M Tris-HCl pH 8.0

3.2.2.1.4.18 0.1 M MgCl2

3.2.2.1.4.19 DL – isocitric acid

3.2.2.1.4.20 NADP

3.2.2.1.4.21 5 mg/ml PMS

3.2.2.1.4.22 0.2 M Tris-HCl pH 8.0

3.2.2.1.4.23 MTT

3.2.2.1.4.24 shikimic acid

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2.2 อุปกรณ์

3.2.2.2.1 ตู้แช่แข็งที่ปรับอุณหภูมิเป็น -20 องศาเซลเซียส และตู้เย็น

3.2.2.2.2 ชุดอิเล็คโทรโฟรีซีสแบบ slab gel

3.2.2.2.3 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า Model 1000/500

3.2.2.2.4 เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.2.2.2.5 เครื่องวัดความเป็นกรด – ด่าง ของสารละลาย (pH meter)

3.2.2.2.6 ไมโครปิเปต

3.2.2.2.7 หลอดใส่สาร (eppendrof tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.2.2.2.8 ชุดอ่านเจล (visible light transilluminator)

3.2.2.2.9 เครื่องแก้ว

3.2.2.2.10 หลอดใส่สารปรับปริมาตรได้ (syringe) ขนาด 50 ไมโครลิตร

3.2.2.2.11 อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น กล่องโฟม แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ กระดาษชั่งสาร ถุงมือ ปากคีบ ช้อนตักสาร พลาสติกใส ถาดพลาสติก กระดาษติดป้าย กล้องถ่ายภาพดิจิตอล

3.2.2.3 วิธีการ

3.2.2.3.1 การทำโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส ประกอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบ slab gel (Mini-Protean II Cell ของบริษัทBio-Rad) เข้าด้วยกัน จากนั้นเตรียมสารละลายของเจล 7.5 % สำหรับ separating gel โดยผสมสารจากส่วนผสมที่แสดงไว้ในตาราง 2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2 ส่วนผสมของสารเคมีในการเตรียม Separating gel (Kuntapanom and Smitamana, 1997)

Stock solution	7.5% Separating gel	
น้ำกลั่น	9.7	มิลลิลิตร
1.5 M Tris pH 8.8	5.0	มิลลิลิตร
30% acrylamide	5.0	มิลลิลิตร
10% APS	200.0	ไมโครลิตร
TEMED	10.0	ไมโครลิตร

เมื่อเตรียมสารละลายเจลเรียบร้อยแล้วนำสารละลายมาเทลงระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ จากนั้นต่อชุดอิเลกโทรโฟรีซีสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม running buffer ลงใน chamber แล้ว หยอดตัวอย่างที่ผสมกับ bromophenol blue ในอัตราส่วน 9:1 ลงในช่องของ stacking gel 20 ไมโครลิตรต่อช่อง โดยไม่ให้ตัวอย่างผสมปนกันในแต่ละช่อง ปิดฝาครอบแล้วต่อขั้วไฟเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า เปิดสวิทช์ให้กระแสไฟผ่านโดยใช้กระแสไฟ 20 มิลลิแอมแปร์ ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟ เมื่อสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่มาถึงปลายล่างของเจล จากนั้น นำแผ่นกระจกออกจาก chamber แล้วแกะเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นกระจกออกมาวางบนจานแก้ว เพื่อย้อมสีเอนไซม์ต่อไป

3.2.2.3.2 การย้อมสีเอนไซม์ในเจล

นำเจลที่ได้มาย้อมด้วย staining solution ของไอโซไซม์ตามระบบเอนไซม์ 7 ชนิด คือ EST, POX 1 และ POX 2, ACP 1 และ ACP 2, IDH และ SKD (ภาคผนวก 2)

3.2.2.3.3 การบันทึกข้อมูล

นำเจลที่ย้อมสีมาบันทึกค่าการเคลื่อนที่ของแถบสี คำนวณค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) บันทึกจำนวนและรูปแบบการเกิดแถบสี วาด Schematic zymogram บันทึกการมีและไม่มีแถบสีในตำแหน่งเดียวกัน

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพัทธ์} = \frac{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของแถบสี}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของ marker}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 4 การปลูกประเมินสายพันธุ์งา

4.1 วัสดุ

4.1.1 วัสดุพันธุ์พืช เมล็ดพันธุ์งาที่ได้จากการทดลองที่ 3.1

4.1.2 วัสดุปลูก ได้แก่ ดิน : เปลือกถั่ว : ปุ๋ยคอก ในอัตรา 1 : 1 : 1

4.2 อุปกรณ์

4.2.1 ถุงพลาสติกเพาะสีดำ ขนาด 10 × 20 นิ้ว จำนวน 200 ถุง

4.2.2 สายยางรดน้ำ

4.2.3 ถาดเพาะ ช้อนปลูก แผ่นป้าย ลวด

4.2.4 ไม้บรรทัด ไม้วัดความสูง

4.2.5 พลาสติกคลุมแปลงสีดำ - เทา

4.2.6 แผ่นเทียบสี Munsell Limit Color Cascade ของบริษัท Munsell Color, USA

4.2.7 ตู้อบ

4.2.8 กล้องถ่ายภาพดิจิตอล

4.3 วิธีการทดลอง

4.3.1 เพาะเมล็ดงาทั้ง 10 สายพันธุ์ ในถาดเพาะ จากนั้นย้ายปลูกในถุงดำ ขนาด 10 × 20 นิ้ว ที่บรรจุวัสดุเพาะได้แก่ เปลือกถั่ว ปุ๋ยคอก ดิน

4.3.2 การเตรียมแปลง เตรียมแปลงทดลองขนาด 1.20 × 10.5 เมตร จำนวน 5 แปลง โดยเว้นหัวแปลงและท้ายแปลง 10 เซนติเมตร แล้วคลุมแปลงด้วยพลาสติกคลุมแปลง สีดำ - เทา จากนั้นนำถุงปลูกวางบนแปลง

4.3.3 วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD โดยใช้จำนวนต้นที่คัดเลือกได้มาทำการทดลอง แต่ละสายพันธุ์ มี 2 ซ้ำ ๆ ละ 10 ต้น มี 2 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 ไม่ได้รับสารโคลชิซิน (c_0)

กรรมวิธีที่ 2 ได้รับสารโคลชิซิน (c_1)

4.3.4 คัดเลือกสายพันธุ์งา ที่มีศักยภาพในการใช้เป็นไม้ดอกไม้ประดับ ต้นที่มีลักษณะที่ต้องการ เช่น ดอกมีขนาดใหญ่ ทรงต้นกะทัดรัด

4.3.5 เก็บเมล็ดพันธุ์งา จากนั้นนำฝักงาใส่ถุงกระดาษเข้าตู้อบ อุณหภูมิ 60 - 70 องศาเซลเซียส นาน 24 - 48 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.4 การบันทึกผลการทดลอง

4.4.1 ระยะเวลาในการให้ดอกแรก (ตั้งแต่เริ่มเพาะเมล็ดจนถึงดอกแรกบาน)

4.4.2 ช่วงเวลาการให้ดอก (ตั้งแต่ดอกแรกเริ่มบานจนถึงดอกสุดท้ายบาน)

4.4.3 สีกลีบดอกบน และสีกลีบดอกด้านล่าง

4.4.4 ขนาดดอก

4.4.5 ลักษณะของใบ

4.4.6 ความสูงของลำต้นข้อแรกที่ให้ดอก วัดจากโคนต้นถึงข้อแรกที่ให้ดอก

4.4.7 ความสูงต้นเฉลี่ย วัดจากโคนต้นถึงปลายยอด

สถานที่ดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. แปลงทดลองภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

เดือนเมษายน 2547 ถึง เดือนมกราคม 2550

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved