

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 การทดลองที่ 1 การขยายพันธุ์โดยการผสมตัวเอง

เพาะเมล็ดพันธุ์ผักกาดหัวที่คัดเลือกมาแล้วพันธุ์ต่าง ๆ ดังนี้ 1-8, 18-1-1, 30-1-8, 54-8, 56-3-6, 62-2-2, 68-2, 75-2-2, 77-9-2, 80-8, 84-1-1 และ 87-3-1 โดยเพาะในจานเลี้ยงเชื้อที่รองด้วยกระดาษเพาะเมล็ด ใส่เมล็ดให้กระจาย ใช้น้ำผสมกับเบนเลทอัตรา 1-2 กรัมต่อน้ำ 50 มิลลิลิตร รดให้ชุ่มทั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเมล็ดเริ่มงอกนำใส่ตู้เย็นอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ให้เมล็ดได้รับอุณหภูมิต่ำ (vernalize) เป็นเวลา 15 วัน

ย้ายปลูกลงกล่องฟิล์มในห้องควบคุม 22 ± 3 องศาเซลเซียส ให้แสงตลอดเวลาด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสง 9000 ลักซ์ ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 80 % ให้น้ำทุกวันและ Hoagland's Solution อาทิตย์ละ 1 ครั้ง เมื่อเริ่มออกดอกทำการผสมเกสรในระยะดอกอ่อนด้วยมือ

ย้ายปลูกในแปลงที่เตรียมไว้โดยใช้ระยะปลูก 25 x 30 เซนติเมตร ปลูกแปลงละ 1 พันธุ์ พันธุ์ละ 10 ต้น ดังแสดงในรูปที่ 3.1 การปฏิบัติดูแลโดยการใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 อัตรา 1 ช้อนโต๊ะ ต่อดันเป็นปุ๋ยรองก้นหลุม และใช้ปุ๋รดานรองก้นหลุมในอัตรา 3 กรัมต่อหลุมในขณะปลูก หลังจากปลูก 15 วันให้ปุ๋ยยูเรีย (46-0-0) อัตรา 1 ช้อนชาต่อดันและให้ต่อไปทุก ๆ สัปดาห์ มีการฉีดพ่นอไซดรินเพื่อป้องกันและกำจัดแมลง ใช้ฝางช่วยในการผสมเกสรโดยให้คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ในระยะหลังการผสมเกสร 2 ชั่วโมงเพื่อเพิ่มการติดเมล็ด ดังแสดงในรูปที่ 3.2 หลังจากปลูกประมาณ 2 เดือนสามารถเก็บเมล็ดพันธุ์ได้



รูปที่ 3.1 แปลงผักกาดหัวที่ใช้มุ้งช่วยในการผสมเกสร



รูปที่ 3.2 แปลงผักกาดหัวที่ให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เพื่อเพิ่มการติดเมล็ด

3.2 การทดลองที่ 2 การผสมข้ามแบบพบกันหมด

เพาะเมล็ดผักกาดหัวพันธุ์หมายเลข 18-6-7, 18-1, 27-1-3, 56-1-1, 59-10, 59-10-7, 59-10-9, 62-8-1, 62-9-4, 62-2, 75-2 และ 77-4 ในจานเลี้ยงเชื้อที่รองด้วยกระดาษเพาะเมล็ด ใส่มล็ดให้กระจาย ใช้น้ำผสมกับเบนเลทอัตรา 1-2 กรัมต่อน้ำ 50 มิลลิลิตร รดให้ชุ่มทั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเมล็ดเริ่มงอกนำใส่ตู้เย็นเพื่อให้เมล็ดได้รับอุณหภูมิต่ำเพื่อกระตุ้นการออกดอกเป็นเวลา 15 วัน แล้วย้ายปลูกในกล่องฟิล์มที่เตรียมไว้กล่องละ 1 ต้น วางกล่องฟิล์มบนแผ่นโฟมที่บุด้วยผ้าริลानและวางในถาดอลูมิเนียมถาดละ 20 ต้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 22 ± 3 องศาเซลเซียส ให้แสงตลอดเวลาด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสง 9000 ลักซ์ ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 80 % ให้น้ำทุกวัน และ Hoagland's Solution อาทิตย์ละ 1 ครั้ง ดังแสดงในรูปที่ 3.3 ประมาณ 20-30 วัน ผักกาดหัวจะเริ่มแทงช่อดอกโดยไม่ผ่านการลงหัว หลังจากดอกบานก็จะเริ่มทำการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ต่างๆ ดังตารางที่ 3.1 โดยทำผสมดอกอ่อน ดังแสดงในรูปที่ 3.4 หลังจากปลูกประมาณ 2 เดือนก็สามารถเก็บเมล็ดพันธุ์ได้



รูปที่ 3.3 การปลูกผักกาดหัวในห้องควบคุมอุณหภูมิ 22 ± 3 องศาเซลเซียส ให้แสงตลอดเวลา ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 80 %

ตารางที่ 3.1 การผสมข้ามของผักกาดหัวสายพันธุ์ต่าง ๆ

สายพันธุ์แม่ หมายเลข	สายพันธุ์พ่อหมายเลข						
	18	27	56	59	62	75	77
18		x	x	x	x	x	x
27	x		x	x	x	x	x
56	x	x		x	x	x	x
59	x	x	x		x	x	x
62	x	x	x	x		x	x
75	x	x	x	x	x		x
77	x	x	x	x	x	x	

โดยใช้พันธุ์หมายเลข 18-6-7, 18-11

27-1-3

56-1-1

59-10, 59-10-7, 59-10-9

62-8-1, 62-9-4, 62-2

75-2

77-4



รูปที่ 3.4 การใช้ละอองเกสรตัวผู้จากพันธุ์อื่น ในการผสมข้าม

3.3 การทดลองที่ 3 การทดสอบลักษณะการผสมตัวเองไม่ติดโดยวิธีผสมดอกตูมและดอกบานในข้อเดียวกัน และวิธีตรวจสอบหลอดเกสรตัวผู้ภายในก้านชูเกสรตัวเมีย

การทดลองที่ 3.1 วิธีผสมดอกตูมและดอกบานในข้อเดียวกัน

1. การเตรียมดอก

เลือกช่อดอกจากกิ่งแขนงเพื่อให้มีจำนวนช่อดอกเพียงพอ และแข็งแรงสม่ำเสมอในการทดสอบ เลือกช่อดอกที่เริ่มบานโดยมีดอกบานแล้ว 3-4 ดอก ตัดดอกที่บานแล้วทิ้งแล้วคลุมช่อดอกด้วยถุงกระดาษ ดังแสดงในรูปที่ 3.5

2. การผสมเกสร

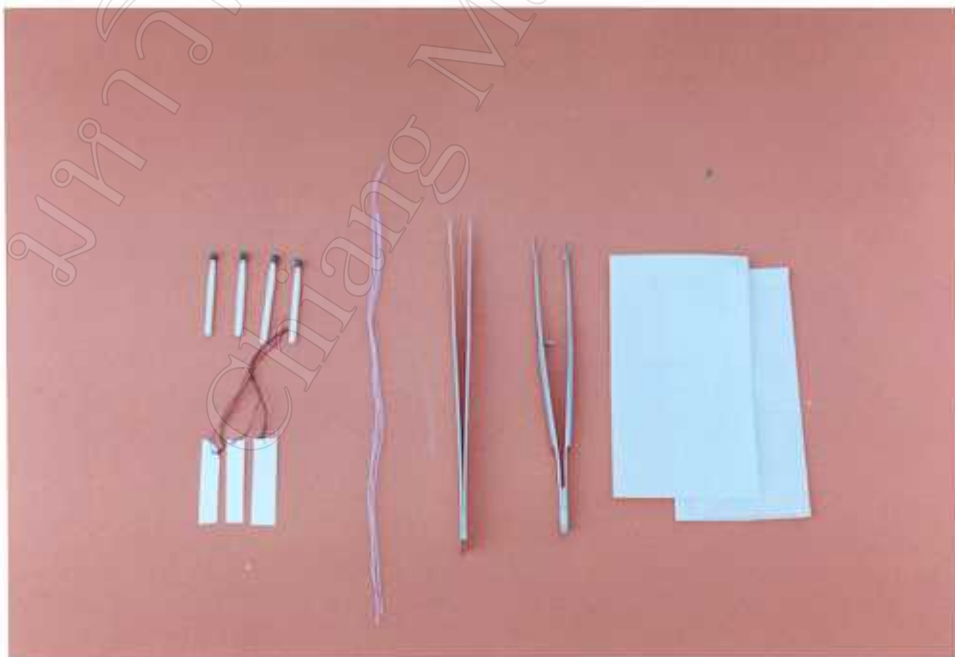
หลังคลุมกระดาษ 3-5 วัน เปิดถุงกระดาษออกเลือกดอกอ่อนซึ่งพร้อมจะบานภายใน 1-2 วัน และดอกที่บานแล้วอย่างละ 10 ดอกใช้ไหมพรมผูกกระหว่างดอกทั้งสองเพื่อเป็นเครื่องหมายแสดงความแตกต่างในระยะเก็บเกี่ยว ใช้ปากคีบดึงกลีบดอกอ่อนให้ยอดเกสรตัวเมียโผล่ออกมาใช้ละอองเกสรตัวผู้จากดอกที่บานภายในต้นเดียวกันแต่ละลงบนยอดเกสรตัวเมียในดอกอ่อน ดังแสดงในรูปที่ 3.6 , 3.7 และ 3.8 ส่วนดอกที่บานใช้ละอองเกสรจากต้นเดียวกันช่วยผสมเกสรทุกดอกแล้วคลุมถุงกระดาษ

3. การบันทึกผล

หลังจากผสมเกสร 2 สัปดาห์เอาถุงกระดาษออก และเก็บเกี่ยวเมล็ดหลังการผสมเกสร 60 วัน แล้วตรวจนับจำนวนฝักและจำนวนเมล็ดที่เจริญจากดอกอ่อนและดอกบาน นำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด



รูปที่ 3.5 การคลุมช่อดอกด้วยถุงกระดาษไขสีขาว
เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของละอองเกสรระหว่างผสม



รูปที่ 3.6 อุปกรณ์ที่ใช้ในการผสมเกสร



รูปที่ 3.7 การใช้ปากคีบดึงกลีบดอกให้เหลือแต่เกสรตัวเมีย



รูปที่ 3.8 การใช้ละอองเกสรตัวผู้จากดอกบานในต้นเดียวกัน ในการผสมตัวเองขณะดอกอ่อน

การทดลองที่ 3.2 วิธีตรวจสอบหลอดเกสรตัวผู้ภายในก้านชูเกสรตัวเมีย

1. การคลุมดอกและการเตรียมดอก

คัดเลือกดอกที่สมบูรณ์ ไม่มีแมลงเข้าทำลาย ตัดดอกที่บานแล้วทิ้ง แล้วคลุมช่อดอกด้วยถุงกระดาษทิ้งไว้ประมาณ 2 - 3 วัน นำดอกที่คลุมไว้ซึ่งมีทั้งดอกตูมและดอกบานใส่ในจานเลี้ยงเชื้อที่ติดเบอร์พันธุ์ แยกดอกตูมและดอกบานใส่ในจานเลี้ยงเชื้อแต่ละอัน

2. การเตรียมความชื้นสัมพัทธ์ 98% ภายในจานเลี้ยงเชื้อ

ต้ม potassium dicromate ($K_2Cr_2O_7$) กับน้ำจนอิ่มตัวเทใส่จานเลี้ยงเชื้อขณะยังร้อนประมาณครึ่งหนึ่งของจานเลี้ยงเชื้อปิดฝาทิ้งไว้ให้เย็น

3. การผสมเกสร

นำดอกที่ได้จากขั้นตอนแรกมาผสมโดยแยกทำดอกตูมก่อนดอกบานเพราะเป็นการป้องกันไม่ให้ยอดเกสรตัวเมียปนเปื้อนเกสรอื่น ใช้ปากคีบคีบกลีบดอกและเกสรตัวผู้ออกให้หมดเหลือเฉพาะก้านดอกและเกสรตัวเมีย ดังแสดงในรูปที่ 3.9



รูปที่ 3.9 ดอกปกติและดอกที่เตรียมไว้สำหรับผสมเกสร

นำดอกที่เตรียมทั้งหมดมาผสมเกสร โดยแบ่งดอกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มควบคุม (control) ไม่ได้รับการผสมทั้งดอกตูมและดอกบาน กลุ่มผสมตัวเอง (self-pollination) ดอกตูมและดอกบานได้รับการผสมเกสรจากต้นเดียวกัน และกลุ่มผสมข้าม (cross-pollination) ดอกตูมและดอกบานได้รับการผสมเกสรจากพันธุ์อื่น นำดอกที่เตรียมไว้แล้ววางบนสไลด์ซึ่งอยู่บนแท่งแก้วภายในจานเลี้ยงเชื้อที่มี saturated potassium dichromate ปิดฝาเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง

4. การทำให้อ่อนนุ่ม

นำดอกที่เลี้ยงไว้ครบ 24 ชั่วโมง แยกใส่หลอดทดลองเป็นกลุ่ม ๆ เติม NaOH 1 N ให้ท่วมดอกในหลอด นำไปต้มใน waterbath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

5. การย้อมสี

นำหลอดทดลองที่ผ่านการต้มจากขั้นตอนที่ 4 เทสารละลาย NaOH ออกให้หมดแล้วเติม Aniline blue 0.2% ใน $K_3PO_4 \cdot 3H_2O$ 2% ให้ท่วมดอก นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6. การทำสไลด์

เท aniline blue 0.2% ใน $K_3PO_4 \cdot 3H_2O$ 2% ออก นำส่วนยอดเกสรตัวเมียวางบนสไลด์โดยแยกดอกที่ไม่ได้รับการผสม (controlled) ดอกที่ผสมตัวเอง (selfed) และดอกที่ผสมข้าม (crossed) หยด glycerol 1 หยดปิดด้วย cover slip แล้วขยี้ (squash) ปิดขอบ cover slip ด้วยยาทาเล็บ

7. การบันทึกผล

นำสไลด์ไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้แสง fluorescent ความเข้มแสง 100 วัตต์ ดังแสดงในรูปที่ 3.10 ตรวจสอบจำนวน pollen tube ที่เจริญโดยบันทึกเป็นเปอร์เซ็นต์ คือ 0, 30, 50, 80 และ 100 หมายถึง ไม่มี pollen tube เมื่อเทียบกับจำนวน pollen บน stigma, มี pollen tube งอก 1 ใน 3 ของจำนวน pollen บน stigma, มี pollen tube งอก 2 ใน 3 ของจำนวน pollen บน stigma และมี pollen tube งอกเกือบทั้งหมดเมื่อเทียบกับจำนวน pollen บน stigma ตามลำดับ



รูปที่ 3.10 กล้องจุลทรรศน์ที่ใช้น้ำแสง fluorescent

3.4 การทดลองที่ 4 การแยกกลูคโสมจากพืชมโดยใช้อิเล็กโทรโฟรีซิส

1. การสกัดโปรตีนอย่างหยาบ

นำต้นกล้าผักกาดหัวลูกผสมและพ่อแม่ เก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อชะงักการทำงานของโปรตีน ใช้ต้นกล้าผักกาดหัวแช่แข็งแต่ละเบอร์หนัก 3 กรัม ผสมกับ tris-buffer 0.1 M pH 8.2 จำนวน 5 มล. บดในโกร่งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (เก็บโกร่งในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส) นำมากรองผ่านผ้าขาวบางสองชั้น จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที

2. การเตรียมสารละลายเข้มข้น

2.1 สารละลายเข้มข้น A pH 8.9

นำ Tris 36.6 กรัม และ TEMED 0.23 มล. ละลายในน้ำกลั่น 20 มล. ปรับ pH ให้ได้ 8.9 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มล. เก็บในขวดสีชาในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส

2.2 สารละลายเข้มข้น B pH 6.7

นำ Tris 5.98 กรัม และ TEMED 0.46 มล. ละลายในน้ำกลั่น 20 มล. เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 N จำนวน 48 มล. ปรับ pH ให้ได้ 6.7 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มล. เก็บในขวดสีชาในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส

2.3 สารละลายเข้มข้น C

ละลาย acrylamide 28.0 กรัม และ bisacrylamide 0.735 กรัม ในน้ำกลั่น 20 มล. เติมน้ำให้ครบ 100 มล. กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส

2.4 สารละลายเข้มข้น F

ละลาย ammonium persulphate 0.1 กรัม ในน้ำ 1 มล. เตรียมใช้ทันที

3. การเตรียมเจล (Vertical slab gel)

3.1 การเตรียมแผ่นกระจกสำหรับใส่เจล (gel mould)

แผ่นกระจกที่ใช้เตรียมเจลมีสองแผ่นประกบกัน ทำความสะอาดแผ่นกระจกโดยการเช็ดด้วย acetone หรือ alcohol ประกบแผ่นกระจกตามความหนาที่ต้องการโดยใช้ spacer ประกบแล้วตรึงแผ่นกระจกเข้ากับขาตั้ง (cast stand) วางบนแท่นเตรียมเจล (gel mould supporter)

3.2 การเตรียม running หรือ separating gel

ผสมสารละลายเข้มข้น A:C:F:น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:2:4:1 คนให้เข้ากัน เทเจลลงใน gel mould ที่เตรียมไว้ สูงประมาณ 12 เซนติเมตร เทน้ำกลั่นลงไปบนแผ่นกระจกเพื่อรักษาผิวหน้าของเจล ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวอย่างสมบูรณ์ประมาณ 1-2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเทน้ำกลั่นที่รักษาหน้าเจลทิ้งให้หมด รอจนผิวหน้าหมดน้ำกลั่น จึงหยอด stracking gel

3.3 การเตรียม stacking หรือ spacer gel

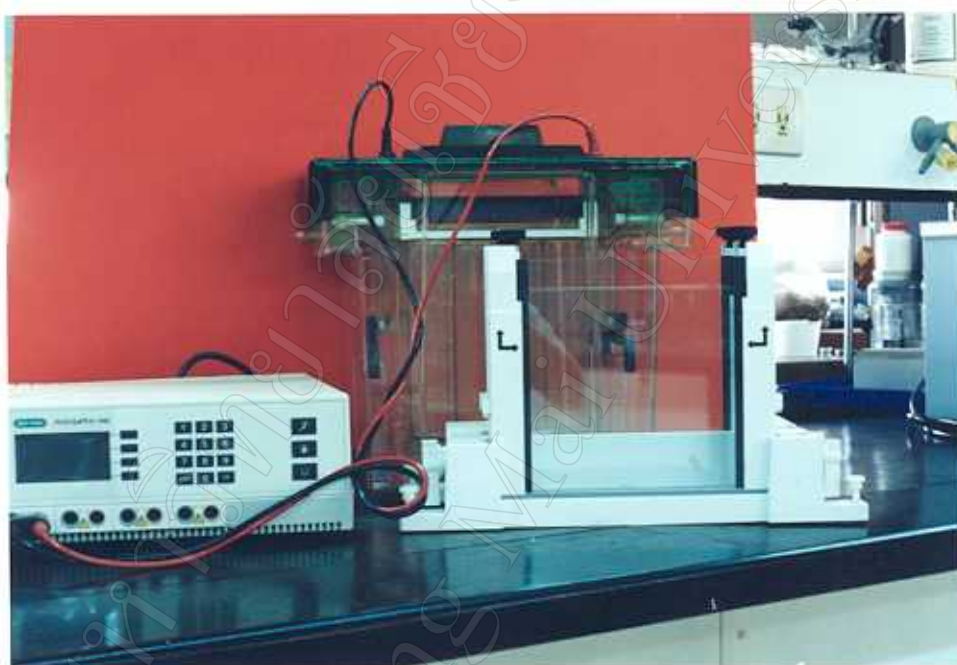
ผสมสารละลายเข้มข้น B:C:F:น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:2:1:4 คนให้เข้ากัน นำไปเทลงในแผ่นกระจกเดิมที่เตรียม running gel พร้อมกับเสียบหวี (comb) เพื่อกำหนดช่องว่างสำหรับหยอดตัวอย่าง ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวนานประมาณ 1 ชั่วโมง จึงดึงหวีที่เสียบไว้ออก ล้างผิวหน้าเจล 4-5 ครั้งด้วยน้ำกลั่น

4. การแยกแถบโปรตีน

นำส่วนบนของ chamber มาประกบกับแผ่นเจลที่เตรียมไว้ เติมสารละลายบัฟเฟอร์ที่สำหรับผ่านกระแสไฟฟ้า (electrode buffer) ลงในถัง บรรจุสารละลายด้านบนและด้านล่าง ดังแสดงในรูปที่ 3.11 หยอดตัวอย่างที่สกัดไว้ลงในช่องว่างที่ดึงหวีออกแล้ว จำนวน 50 μ l ระวังอย่าให้ตัวอย่างผสมปนกัน ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 4-7 องศาเซลเซียสตลอดเวลาที่ผ่านกระแสไฟฟ้าโดยการควบคุมของเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบน้ำเย็นหมุนเวียนเข้า-ออก chamber ต่อสายไฟจากเครื่องจ่ายกระแสไฟเข้ากับ chamber ผ่านกระแสไฟฟ้า 2 mA ต่อหนึ่งช่องตัวอย่างเข้าไปในสารละลายบัฟเฟอร์ จนระดับของ marker solution อยู่ห่างจากขอบล่างของเจล 1 นิ้ว จึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า แกะแผ่นกระจก ตัดขอบล่างทางด้านซ้ายของแผ่นเจลเพื่อทราบลำดับของหมายเลขตัวอย่างที่หยอดไป นำเจลแช่ในสารละลายที่ประกอบด้วย substrate, coenzyme และ dye ที่มีความจำเพาะกับเอนไซม์ peroxidase, esterase และ acid phosphatase ในสภาพที่ไม่มีแสง ที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าเบาๆ เพื่อเร่งปฏิกิริยา จนเห็นแถบสีคมชัดที่สุด หลังจากนั้นนำแผ่นเจลล้างน้ำไหลช้าๆ ล้างเจลจนพื้นเจลที่ไม่เกิดแถบสีใส แล้วนำมาแช่ในสารละลาย acetic acid 7% ที่ผสม glycerol 10% เพื่อหยุดปฏิกิริยาและละลายสีส่วนเกินออก

5. การประเมินผล

เขียนรูปแบบของแถบสีตามลำดับความเข้มที่ปรากฏให้เห็นด้วยสายตา ประกอบระยะทางที่เกิดของแถบสี (Rf) แต่ละแถบของเอนไซม์ (Zymogram)



รูปที่ 3.11 เครื่องอิเล็กโทรโพรีซิส