บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1.อุปกรณ์การศึกษา

1.1 พืชทดลอง

เมล็ดกระเจี๊ยบเขียว (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench.) พันธุ์ญี่ปุ่น Yamoto Green และพันธุ์อินเดีย 9701 ได้รับความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ จากคุณปิยะศักดิ์ สุนทรประภัสสร์ บริษัท นพเกศ เทรดดิ้ง จำกัด

1.2 สัตว์ทดลอง

หนอนกระทู้หอม (Beet Armyworm, *Laphygma exigua* (Hübner)) ผลิตโดย ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงหนอนกระทู้หอม กลุ่มวิจัยกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

1.3 วัสดุอุปกรณ์

1.3.1 วัสดุอุปกรณ์ในการศึกษาผลของขนาดพอลิเมอร์และความเข้มข้นของไคโตซานต่อการเติบโตของต้นกระเจี๊ยบเขียว จำนวน และคุณภาพของฝักกระเจี๊ยบเขียว

1.3.1.1. ดินถุงสำเร็จรูป (ตรา ดินโอชะ กำนันเจิม แขวงวังทองหลาง เขตบางกะปิ กรุงเทพมหานคร) จำนวน 800 ถุง

1.3.1.2. ปุ๋ยคอก (มูลวัวแห้ง) จำนวน 40 ถุง

1.3.1.3. อุปกรณ์การเกษตร ได้แก่

จอบ จำนวน 5 ด้าม

เสียม จำนวน 3 ด้าม

พลั่ว จำนวน 4 อัน

คราด จำนวน 2 อัน

มีดดายหญ้า จำนวน 2 เล่ม

มีดขนาดเล็ก จำนวน 2 เล่ม

เลื่อยมือ จำนวน 2 อัน

บุ้งกี๋ จำนวน 2 อัน

ช้อนปลูก จำนวน 2 อัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถังเหล็กเคลือบสีสำหรับใส่น้ำขนาดปริมาตร 100 l จำนวน 4 ถัง
ถังพลาสติกขนาดปริมาตร 10 ลิตร จำนวน 10 ใบ
บัวรดน้ำขนาดปริมาตร 5 ลิตร จำนวน 2 ใบ
สายยางส่งน้ำ ยาว 25 m
ปั๊มน้ำ จำนวน 1 ตัว
ถังพ่นสารละลายปุ๋ยแบบอัดอากาศ ขนาดปริมาตร 4 l จำนวน 4 ใบ
แกลลอนใส่สารละลายปุ๋ยขนาดปริมาตร 20 l จำนวน 10 ใบ
ถ้วยพลาสติกสำหรับแช่เมล็ด จำนวน 10 ใบ
ถุงมือผ้า จำนวน 10 คู่
สายวัดความยาว 1 เส้น
เชือกยาว 2 เมตร จำนวน 1 เส้น
เชือกฟาง จำนวน 4 ม้วน
ตลับเมตร จำนวน 1 ตลับ

1.3.1.4. อุปกรณ์สำหรับเตรียมสารละลายปุ๋ยและไคโตซาน ได้แก่
Micropipette ขนาดปริมาตร 200 และ 1,000 µl จำนวนชนิดละ 1 อัน
Micropipette tips ขนาดดูดสารปริมาตร 200 µl จำนวน 100 อัน
Micropipette tips ขนาดดูดสารปริมาตร 1,000 µl จำนวน 100 อัน
แท่งแก้วคนสาร จำนวน 1 แท่ง
กรวยพลาสติกขนาดใหญ่ จำนวน 1 อัน
กระบอกตวง ขนาดปริมาตร 10 50 100 500 1,000 และ 2,000 ml จำนวนอย่างละ 1 กระบอก
เครื่องชั่งดิจิตอลชนิดบอกเลขทศนิยม 2 ตำแหน่ง จำนวน 1 เครื่อง

1.3.1.5. อุปกรณ์อื่น ๆ
กล้องถ่ายภาพจำนวน 2 กล้อง
เครื่องเขียนและไม้บรรทัด จำนวน 2 ชุด
ซองกระดาษสีน้ำตาลขนาดใหญ่ จำนวน 300 ซอง
ป้ายชื่อและแบบฟอร์มการบันทึกผลการทดลอง
ล้อเข็นสำหรับย้ายต้นไม้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถุงดำสำหรับใส่ขยะขนาดกลาง จำนวน 40 ถุง

ถุงดำสำหรับใส่ขยะขนาดใหญ่ จำนวน 20 ถุง

1.3.2 วัสดุอุปกรณ์ในการศึกษาผลของขนาดพอลิเมอร์และความเข้มข้นของไคโตซานต่อการติดเชื้อไวรัสเส้นใบเหลืองในกระเจี๊ยบเขียว

1.3.2.1. อุปกรณ์สำหรับทำการเพาะปลูกกระเจี๊ยบเขียว

เช่นเดียวกับข้อ 1.3.1

1.3.2.2. อุปกรณ์สำหรับบันทึกลักษณะอาการของโรค เก็บตัวอย่าง และเก็บรักษาใบกระเจี๊ยบเขียว

กล้องถ่ายภาพระบบดิจิตอล จำนวน 1 กล้อง

ถุงพลาสติกใส จำนวน 20-30 ถุง

ถุงหิ้วพลาสติก จำนวน 5 ถุง

กระดาษขนาด A4 จำนวน 50 แผ่น

กล่องโฟมรักษาความเย็น จำนวน 5 กล่อง

มีดปอกผลไม้ จำนวน 1 เล่ม

ปากกาเคมี จำนวน 1 ด้าม

ตู้แช่แข็ง – 70 °C จำนวน 1 ตู้

กระบอกทรงสูงมีฝาปิดใส่ไนโตรเจนเหลว ขนาดปริมาตร 1 l จำนวน 1 กระบอก

กระติกทรงเตี้ยใส่ไนโตรเจนเหลวชนิดมีฝาปิด ขนาดปริมาตร 1 l จำนวน 2 กระติก

เครื่องชั่งดิจิตอลชนิดบอกเลขทศนิยม 2 ตำแหน่ง จำนวน 1 เครื่อง

1.3.2.3. อุปกรณ์สำหรับ สกัด DNA และตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเส้นใบเหลืองโดยวิธี Southern blot hybridization

ตู้เย็น จำนวน 2 ตู้

เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแบบอัดความดัน จำนวน 1 เครื่อง

เครื่อง Refridgerated Centrifuge จำนวน 1 เครื่อง

เครื่อง Speed vacuum (DNA 110 Speed Vac) จำนวน 1 เครื่อง

เครื่อง เขย่าในแนวราบ (Belly dancer) จำนวน 1 เครื่อง

เครื่อง Electrophoresis apparatus พร้อม Power supply จำนวน 2 ชุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เครื่อง UV Crosslink จำนวน 1 เครื่อง

เครื่อง Hybridization water bath จำนวน 2 เครื่อง

เครื่อง Hybridization oven พร้อมอุปกรณ์ จำนวน 1 ชุด

เครื่องอ่าน Gel พร้อม Document and analysis system จำนวน 1 เครื่อง

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) จำนวน 1 เครื่อง

เครื่อง Hot plate จำนวน 1 เครื่อง

เครื่องวัด pH จำนวน 2 เครื่อง

เครื่อง Vortex mixer จำนวน 1 เครื่อง

เครื่องชั่งดิจิตอลชนิดทศนิยม 2 ตำแหน่ง จำนวน 1 เครื่อง

เครื่องชั่งดิจิตอลชนิดทศนิยม 4 ตำแหน่ง จำนวน 1 เครื่อง

เครื่องไมโครเวฟ จำนวน 1 เครื่อง

ตู้ดูดควัน (Fume hood) จำนวน 1 ตู้

ตู้อบความร้อนอุณหภูมิ 180 °C จำนวน 1 ตู้

ตู้อบความร้อนอุณหภูมิ 60 °C จำนวน 1 ตู้

ตลับประกบฟิล์ม X-ray (Hypercassette™) ขนาด 18×24 ซ.ม. จำนวน 1 ตลับ (ตรา Amersham Life Science, Amersham International plc, Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, สหราชอาณาจักร)

Medical X-ray film (ตรา Kodak, บริษัท Eastman Kodak Company, Windsor, Colorado, สหรัฐอเมริกา)

โกร่งและอุปกรณ์สำหรับบดตัวอย่างพืช จำนวน 40 ชุด

หลอด Eppendorf ขนาดปริมาตร 1.5 ml จำนวน 500 หลอด

หลอด Centrifuge ขนาดปริมาตร 15.0 ml จำนวน 40 หลอด

หลอด Centrifuge ขนาดปริมาตร 50.0 ml จำนวน 30 หลอด

Micropipette ขนาดปริมาตร P10 P200 และ P1,000 µl ชนิดละ 2 อัน

Micropipette tips ขนาดดูดสารปริมาตร 1,000 µl จำนวน 500 ชิ้น

Micropipette tips ขนาดดูดสารปริมาตร 200 µl จำนวน 500 ชิ้น

Micropipette tips ขนาดดูดสารปริมาตร 10 µl จำนวน 100 ชิ้น

กระดาษกรองขนาด 8×11 cm จำนวน 40 ชิ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กระดาษกรองขนาด 8×35 cm จำนวน 10 ชิ้น

กระดาษ Hybond $-N^+$ membrane ขนาด 8×11cm จำนวน 10 ชิ้น(บริษัท Amersham Biosciences UK Limited, Amersham Place, Little Chalfont, สหราชอาณาจักร)

กะละมังพลาสติก ขนาด 20×40×10 cm จำนวน 2 ใบ

กล่องพลาสติก ขนาด 12×12×6 cm จำนวน 2 ใบ

หม้อต้มน้ำ ขนาดปริมาตร 1 l จำนวน 1 ใบ

กล่องโฟมสำหรับใส่น้ำแข็ง ขนาด 10×15×7 นิ้ว จำนวน 2 กล่อง

กระบอกทรงสูงมีฝาปิดใส่ไนโตรเจนเหลวขนาดปริมาตร 1 l จำนวน 1 กระบอก

กระติกทรงเตี้ยใส่ไนโตรเจนเหลวชนิดมีฝาปิดขนาดปริมาตร 1 l จำนวน 2 กระติก

ถาดเหล็กสำหรับใส่อุปกรณ์ต่าง ๆ ในการนึ่งเพื่อฆ่าเชื้อ จำนวน 5 ถาด

ถาดเหล็กหรือพลาสติกสำหรับใส่น้ำยาล้างฟิล์ม X-ray จำนวน 3 ถาด

ตระกร้าพลาสติก ขนาด 30×38×10 cm จำนวน 4 ใบ

ถุงมือยางขนาดเบอร์ L หรือ XL จำนวน 2 กล่อง

ถังน้ำกลั่นขนาดปริมาตร 20 l จำนวน 1 ถัง

ขวดน้ำกลั่นขนาดปริมาตร 500 ml จำนวน 2 ขวด

แท่นสำหรับวางหลอด Eppendorff ขนาดปริมาตร 1.5 ml จำนวน 5 แท่น

คีมคีบขนาดเล็ก จำนวน 5 ชิ้น

คีมคีบขนาดใหญ่ จำนวน 2 ชิ้น

ช้อนตักสาร จำนวน 10 อัน

กรรไกร จำนวน 2 อัน

มีดคัตเตอร์ จำนวน 2 อัน

อะลูมิเนียมฟอยล์ห่ออาหาร จำนวน 4 ม้วน

พลาสติกห่ออาหาร จำนวน 2 ม้วน

กระดาษกาวย่นและเทปใส จำนวนอย่างละ 2 ม้วน

ปากกาเคมีขนาดเล็ก จำนวน 2 ด้าม

กระดาษหนังสือพิมพ์ จำนวน 50 ฉบับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขวดพลาสติกขนาดปริมาตร 1.25 l จำนวน 5 ขวด

ถังกำจัดสาร Ethidium Bromide จำนวน 1-2 ถัง

ถุงดำสำหรับใส่ขยะ จำนวน 10 ใบ

เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น

บิกเกอร์ขนาดปริมาตร 100 250 500 1,000 และ 2,000 ml

กระบอกตวงขนาดปริมาตร 50 100 250 500 1,000 และ 2,000 ml

ขวดแก้วชนิดใสมีฝาปิด

ขวดแก้วสีชา

ขวดรูปชมพู่

หลอดหยดสาร

แท่งแก้วคนสาร

กรวยแยกสารขนาด 1 l

1.3.3 วัสดุอุปกรณ์ในการศึกษาผลของขนาดพอลิเมอร์และความเข้มข้นของไคโตซานต่อปริมาณ Proteinase inhibitor และการกัดกินของหนอนกระทู้หอมในกระเจี๊ยบเขียว

1.3.3.1. อุปกรณ์สำหรับทำการเพาะปลูกกระเจี๊ยบเขียว

ดินถุงสำเร็จรูป (ตรากำนันเจิม) จำนวน 80 ถุง

ปุ๋ยคอก (มูลวัวแห้ง) จำนวน 4 ถุง

กระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 นิ้ว จำนวน 200 ใบ

กระบอกพ่นสารละลายปุ๋ยอัดความดันขนาด 1.75 l จำนวน 4 กระบอก

ช้อนปลูก จำนวน 2 อัน

พลั่ว จำนวน 2 อัน

ผ้าพลาสติกปูพื้นขนาด 2×15 m จำนวน 2 ผืน

ป้ายชื่อจำนวน 200 อัน

ถังเหล็กเคลือบสีสำหรับใส่น้ำขนาดปริมาตร 100 l จำนวน 4 ถัง

บัวรดน้ำขนาดปริมาตร 5 l จำนวน 2 ใบ

1.3.3.2. อุปกรณ์สำหรับการเก็บตัวอย่างใบกระเจี๊ยบเขียวเพื่อนำไปวัด Proteinase inhibitor activity และทดลองการกัดกินของหนอนกระทู้หอม

ตู้เย็น จำนวน 1 เครื่อง

กล่องโฟม ขนาด 10×15×7 นิ้ว จำนวน 2 กล่อง

กล่องพลาสติกแยก 4 ช่อง จำนวน 8 กล่อง

เครื่องเจาะรูกระดาษขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 cm จำนวน 2 อัน

ถ้วยพลาสติกมีฝาปิดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.0 cm จำนวน 350 ถ้วย

กระดาษกรองตัดขนาด 2×2 cm จำนวน 2,000 ชิ้น

กระดาษทิชชูขนาด 4×4 จำนวน 2,000 ชิ้น

กล่องพลาสติกมีฝาปิด ขนาด 17×24×17.5 cm จำนวน 4 กล่อง

จานเพาะเชื้อจำนวน 20 จาน

กระจกนาฬิกาจำนวน 4 ชิ้น

พู่กันขนาด จำนวน 2-3 ด้าม

คีมคีบขนาดเล็กจำนวน 4 อัน

คีมคีบขนาดใหญ่ จำนวน 1 ชิ้น

Micropipette ขนาดปริมาตร 200 และ 1,000 µl จำนวนชนิดละ 2 อัน

ตระกร้าพลาสติก ขนาด 30×38×10 cm จำนวน 3 ใบ

ชั้นวางของ แบบ 4 ชั้น ขนาด 10.5×18 นิ้ว จำนวน 2 ชุด

ชั้นวางของ แบบ 2 ชั้น ขนาด 10.5×18 นิ้ว จำนวน 1 ชุด

ขวดน้ำกลั่นขนาดปริมาตร 500 ml จำนวน 2 ขวด

ถังน้ำกลั่นขนาดปริมาตร 20 l จำนวน 1 ถัง

อะลูมิเนียมฟอยล์ห่ออาหาร จำนวน 1 ม้วน

ถุงมือยางขนาดเบอร์ L หรือ XL จำนวน 1 กล่อง

โกร่งและอุปกรณ์สำหรับบดตัวอย่างพืช จำนวน 30 ชุด

หลอด Eppendorf ขนาดปริมาตร 1.5 ml จำนวน 400 หลอด

Micropipette tips ขนาดดูดสาร 1,000 ml จำนวน 200 ชิ้น

Micropipette tips ขนาดดูดสารปริมาตร 200 µl จำนวน 300 ชิ้น

แท่นสำหรับวางหลอด Eppendorf ขนาดปริมาตร 1.5 ml จำนวน 2 แท่น

ช้อนตักสาร จำนวน 10 อัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กระบอกทรงสูงมีฝาปิดใส่ไนโตรเจนเหลวขนาดปริมาตร 1 l จำนวน 1 กระบอก

กระติกทรงเตี้ยใส่ไนโตรเจนเหลวชนิดมีฝาปิดขนาดปริมาตร 1 l จำนวน 2 กระติก

เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น

บิกเกอร์ขนาดปริมาตร 100 250 500 1,000 และ 2,000 ml

กระบอกตวงขนาดปริมาตร 50 100 250 500 1,000 และ 2,000 ml

ขวดแก้วขนาดปริมาตร 50 100 250 500 1,000 และ 2,000 ml

ขวดรูปชมพู่ขนาดปริมาตร 100 250 และ 500 ml

ขวดแก้วสีชา

หลอดหยดสาร

แท่งแก้วคนสาร

เครื่องชั่งดิจิตอลชนิดทศนิยม 2 ตำแหน่ง จำนวน 1 เครื่อง

เครื่องชั่งดิจิตอลชนิดทศนิยม 4 ตำแหน่ง จำนวน 1 เครื่อง

เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแบบอัดความดัน จำนวน 1 เครื่อง

เครื่อง Refridgerated Centrifuge จำนวน 1 เครื่อง

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) จำนวน 1 เครื่อง

ตู้ดูดควัน (Fume hood) จำนวน 1 ตู้

ตู้อบความร้อนอุณหภูมิ 180 °C จำนวน 1 ตู้

ตู้อบความร้อนอุณหภูมิ 60 °C จำนวน 1 ตู้

ถุงดำสำหรับใส่ขยะ จำนวน 4 ใบ

1.4 สารเคมี

1.4.1 สารเคมีที่ใช้ในการแช่เมล็ดกระเจี๊ยบเขียว การเตรียมสารละลายปุ๋ย และไคโตซาน

ปุ๋ยสูตรเสมอ 21-21-21 (ตรา ทวินเฟอร์ตี้ บริษัท เสรีเคมีเกษตรและอุตสาหกรรม จำกัด แขวงตลิ่งชัน เขตตลิ่งชัน กรุงเทพมหานคร ทะเบียนเลขที่ 1267/2544 (กรมวิชาการเกษตร))

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไคโตซาน

80% DD Chitosan Polymer form (P80) ขนาดโมเลกุล (M_w) เท่ากับ 460,000 และ 80% DD Chitosan Oligomer form (O80) M_w เท่ากับ 73,000 ได้รับความอนุเคราะห์จาก อาจารย์.ดร.รัฐพิชญางกูร ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ Uncharacterized Commercial Chitosan (UCC) ตรา Biochem-2 ของบริษัทแมเนจเมนท์ เอ็กซ์เซลเลนท์ กรุ๊ป จำกัด กรุงเทพมหานคร

น้ำกรอง

1.4.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA จากใบกระเจี๊ยบเขียว (Dellaporta, Wood, and Hicks, 1983)

3 M Sodium acetate

70 % Ethanol

95 % Ethanol

Distilled water

Isopropanol

Liquid nitrogen

Equilibrated phenol solution

0.1 % 8-Hydroxyquinoline

1 M Tris.HCl (pH 8)

Equilibrated chloroform

Buffer I Solution

100 mM Tris.HCl (pH 8)

500 mM Sodium chloride

50 mM Diaminoethanetetra-acetic acid disodium salt (EDTA) (pH 8)

10 mM Mercaptoethanol

2 % (w/v) Polyvinylpyrrolidone

Buffer II Solution

20 % (w/v) Sodium dodecyl sulfate (SDS)

Buffer III Solution

5 M Potassium acetate

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TE Buffer

10 mM Tris.HCl (pH 8)

1 mM EDTA (pH 8)

1.4.3 สารเคมีสำหรับการเลี้ยงแบคทีเรียและสกัด plasmid DNA ด้วยวิธี Small – scale preparation of plasmid DNA (Sambrook Fritsh and Maniatis, 1989)

LB Medium (Luria- Bertani Medium)

Bacto-tryptone	10g/l
Bacto-yeast extract	5g/l
NaCl	10g/l

LB Agar Medium

LB Medium

1.5 % Agar (w/v)

Ampicillin solution (100 µg/ml)

Solution I

50 mM Glucose

25 mM Tris.HCl (pH 8.0)

10 mM EDTA (pH 8.0)

Solution II

0.2 N NaOH

1 % (w/v) SDS

Solution III

5 M Potassium acetate (pH)

3 M Sodium acetate (pH 5.5)

70 % Ethanol

95 % Ethanol

1.4.4 สารเคมีสำหรับการทำ Southern Blot Hybridization

1.2 % Agarose gel

Ethidium bromide

Distilled water

95 % Ethanol

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ECL™ Direct Nucleic Acid Labelling System (บริษัท Amersham Biosciences UK. Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire,สหราชอาณาจักร)

1X TBE Buffer

1 M Tris.HCl (pH 8)

1 M Boric acid

0.5 M EDTA

20X Nucleic acid transfer buffer (20X SSC (pH 7-8))

0.3 M Tri-sodium citrate

1.5 M Sodium chloride

Depurination solution

250 mM Hydrochloric acid

Denaturing solution

1.5 mM Sodium chloride

0.5 N Sodium hydroxide

Neutralizing solution

0.5 M Tris.HCl (pH 7.5)

1.5 M Sodium chloride

Primary wash solution

6 M Urea

0.4 % (w/v) SDS

0.5 M SSC

Secondary wash solution

2X SSC

X-Ray film detection solution

Developer and Replenisher Solution ขนาดปริมาตร 2.5 l และ Fixer and Replenisher Solution ขนาดปริมาตร 2.5 l (บริษัท Kodak (Wuxi) Company Limited, New District, Wuxi, สาธารณรัฐประชาชนจีน)

5 % Acetic acid (v/v)

Distilled water

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.4.5 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดและวัด Proteinase inhibitor activity และ Total protein

Liquid nitrogen

Distilled water

0.001 N Hydrochloric acid

0.5 mM N α – benzoyl – L- tyrosine ethyl ester (BTEE) EC 222-469-2 (บริษัท SIGMA-ALDRICH Co. St. Louis, MO, USA.)

Chymotrypsin (บริษัท SIGMA-ALDRICH Co. St. Louis, MO, USA.)

Methanol

Trypsin-chymotrypsin inhibitor Type I-S: From Soybean, EC No. 232-906-9 (บริษัท SIGMA-ALDRICH Co. St. Louis, MO, USA.)

Plant extraction buffer (Stout et al., 1998)

50 mM Tris.HCl (pH 7.8)

7 % (w/v) Polyvinylpolypyrrolidone (PPVP)

1.67 mM Phenylthiourea

0.3 M Potassium chloride

0.4 mM Ascorbic acid

1 M Potassium phosphate buffer (pH 8) (Sambrook, Fritsh and Maniatis, 1989)

Dye reagent concentrate สำหรับ Protein assay (ตรา Bio-Rad ขนาด 450 ml บริษัท Bio-Rad Laboratories, 2000 Alfred Nobel Dr., Hercule, CA, USA)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. วิธีการทดลอง

2.1. ผลของขนาดพอลิเมอร์และความเข้มข้นของไคโตซานต่อการเติบโตของต้นกระเจี๊ยบเขียว จำนวนและคุณภาพของผลผลิต

2.1.1. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) เพื่อศึกษาผลของขนาดพอลิเมอร์และความเข้มข้นของไคโตซานต่อการเติบโตของต้นกระเจี๊ยบเขียวพันธุ์ญี่ปุ่น Yamato Green จำนวนและคุณภาพของผลผลิต โดยศึกษาปัจจัยต่อไปนี้คือ

- ชนิดของไคโตซาน 3 ชนิด คือ

-80 % DD Chitosan Polymer form (P80)

-80 % DD Chitosan Oligomer form (O80)

-Uncharacterized commercial chitosan (UCC)

- ระดับความเข้มข้นของไคโตซานที่ใช้ในการศึกษาคือ 25 50 และ 100 ppm

ดังนั้นจึงวางแผนการทดลองแบบ RCBD มีชุดการทดลองเป็น (3X3) + 1 (ชุดควบคุม) แต่ละชุดการทดลองมีจำนวนซ้ำ 6 ซ้ำ เตรียมทำแปลงปลูกจำนวน 6 แปลง แต่ละแปลงแบ่งพื้นที่เป็น 10 แปลงย่อย สำหรับ 10 ชุดการทดลอง ทำการปลูกเป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยก่อนปลูกทำการแช่เมล็ดในสารละลายไคโตซาน และระหว่างการปลูกฉีดพ่นสารละลายไคโตซานทางใบทุก 3 สัปดาห์

2.1.2. การเก็บข้อมูล

2.1.2.1. เก็บข้อมูลการเติบโตของต้นกระเจี๊ยบเขียว โดยวัดความสูงของลำต้นด้วยเชือกและสายวัดความยาว นับจำนวนใบสะสม และจำนวนดอกสะสมต่อต้นทุกสัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลองวัดน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของทั้งต้นไม่รวมราก ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง เพื่อศึกษาผลผลิตมวลชีวภาพของกระเจี๊ยบเขียว นำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยต่อต้น และทำการหาปริมาณน้ำในต้นต่อน้ำหนักสด (เปอร์เซ็นต์) จากสูตร

$$\frac{(\text{น้ำหนักสดเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (g)} - \text{น้ำหนักแห้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (g))} \times 100}{\text{น้ำหนักสดเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (g)}}$$

2.1.2.2. เก็บข้อมูลของจำนวนและคุณภาพของผลผลิต โดยการนับจำนวนฝักเฉลี่ยต่อต้น เมื่อเสร็จสิ้นการทดลองวัดน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของฝักกระเจี๊ยบเขียวต่อฝักด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง นำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยต่อต้น

2.1.2.3. เก็บข้อมูลของของน้ำหนักฝักสดที่คงเหลือ (เปอร์เซ็นต์) หลังการเก็บเกี่ยว โดยการตัดฝักกระเจี๊ยบของแต่ละชุดการทดลอง ที่มีฝักขนาด 8-10 ซ.ม. มาเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการชั่งน้ำหนักสดของฝักกระเจี๊ยบเขียว ทุก ๆ วัน จนครบ 9 วัน ด้วยเครื่อง

ชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง จากนั้นทำการคิดเทียบน้ำหนักของฝักกระเจี๊ยบเขียวที่วัดได้ในแต่ละครั้งกับน้ำหนักของฝักกระเจี๊ยบเขียวที่วัดได้ในวันแรกหลังเก็บเกี่ยว แล้วคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักฝักสดที่คงเหลือในแต่ละวัน และนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยต่อฝัก

2.1.3. การศึกษาผลของไคโตซานต่อกระเจี๊ยบเขียวพันธุ์อินเดีย 9701 ทำการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 2.1.1-2.1.2 แต่เปลี่ยนพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวเป็นพันธุ์อินเดีย 9701

2.1.4. ทำการปลูกกระเจี๊ยบเขียวทั้งสองพันธุ์ที่แปลงทดลองภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ช่วงเดือนมกราคม-มีนาคม พ.ศ. 2547 และ พ.ศ. 2548

2.2 ผลของขนาดพอลิเมอร์และความเข้มข้นของไคโตซานต่อการติดเชื้อไวรัสเส้นใบเหลืองในกระเจี๊ยบเขียว

นำต้นกระเจี๊ยบเขียวพันธุ์อินเดียที่เป็นโรคไวรัสเส้นใบเหลือง เนื่องจากการปล่อยให้ติดเชื้อไวรัสเส้นใบเหลืองตามธรรมชาติไปปลูกในบริเวณแปลงทดลองที่ให้และไม่ให้ไคโตซานดังที่ระบุไว้ในข้อ 2.1 แปลงละ 2 ต้น หลังจากการฉีดพ่นสารละลายไคโตซานครั้งที่ 1 เพื่อให้เกิดการถ่ายทอดเชื้อไวรัสชนิดนี้ตามธรรมชาติ โดยมีแมลงหวี่ขาว (*B. tabaci* Gennadius) เป็นพาหะ (เครือพันธุ์ กิตติปกรณ์, อำนวย อรรถลังรอง และ พิสสวรรณ เจียมสมบัติ, 2542-2543)

2.2.1. จดบันทึกอาการของโรคและจำนวนต้นพืชในแต่ละชุดการทดลองที่แสดงอาการของโรคทุกสัปดาห์

2.2.2. เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำการสุ่มเก็บตัวอย่างใบกระเจี๊ยบเขียวในแต่ละชุดการทดลองทั้งที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการของโรคไวรัสเส้นใบเหลืองมาทำการสกัด DNA ตามวิธีของ Dellaporta Wood และ Hicks (1983) เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเส้นใบเหลืองโดยวิธี Southern blot hybridization (Sambrook, Fritsh and Maniatis, 1989) โดยใช้ DNA-A ของ *Dicliptera yellow mottle virus* (Lotrakul, Valverde and Landry, 2000) เป็น probe และทำการติดฉลาก probe ด้วย ECL kit ตามวิธีแนะนำโดยผู้ผลิต

2.2.3. ทำการศึกษาเช่นนี้ในกระเจี๊ยบเขียวทั้งสองพันธุ์

2.2.4. ทำการปลูกกระเจี๊ยบเขียวทั้งสองพันธุ์ที่แปลงทดลองภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ช่วงเดือนมกราคม-มีนาคม พ.ศ. 2547 และ พ.ศ. 2548

2.2.5. วิธีสกัด DNA จากใบกระเจี๊ยบเขียว **(Dellaporta, Wood and Hicks, 1983)**

2.2.5.1. นำตัวอย่างใบกระเจี๊ยบเขียวน้ำหนักประมาณ 1-1.5 g ซึ่งเก็บที่ – 70 °C มาทำการบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลวโดยใช้โกร่งที่เย็นและผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 180 °C 3 ชั่วโมง

2.2.5.2. เติม Buffer I ที่เย็น ปริมาตร 15 ml ลงในโกร่งที่ทำการบดตัวอย่าง จากนั้นผสมโดยคนให้เข้ากัน

2.2.5.3. เติม Buffer II ปริมาตร 1 ml ลงไป ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเทลงในหลอดทดลองพลาสติกขนาด 50 ml ปิดฝาให้หลวม

2.2.5.4. นำหลอดทดลองดังกล่าวไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 10-15 นาที

2.2.5.5. เติม Buffer III ปริมาตร 5 ml เขย่าผสมให้เข้ากันแล้วนำไปแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 20 นาที

2.2.5.6. นำไปเขย่าผสมด้วยเครื่อง vortex แล้วนำไปทำการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 8,500 rpm นาน 25 นาที

2.2.5.7. เก็บ supernatant มาเติม isopropanal ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดให้แน่น

2.2.5.8. พลิกหลอดไปมาช้า ๆ อย่างเบามือ จะสังเกตเห็น DNA เริ่มรวมตัวและตกตะกอน

2.2.5.9. นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง หรือข้ามคืน (18-24 ชั่วโมง)

2.2.5.10. ทำการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 8,500 rpm นาน 25 นาที

2.2.5.11. เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง จากนั้นดูดเอา isopropanal ส่วนที่เหลือออก แล้วปล่อย ตะกอน DNA ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 60 นาที

2.2.5.12. ละลาย DNA ที่ได้ในน้ำกลั่น ปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร

2.2.5.13. ดูดสารละลาย DNA ใส่ หลอด eppendrof แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 12,000 rpm นาน 10 นาที

2.2.5.14. นำ supernatant มาเติม equilibrated phenol ปริมาตร 700 µl ทำการ vortex แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 12,000 rpm นาน 3 นาที

2.2.5.15. เก็บ upper phase ปริมาตร 650 µl จากนั้นเติม equilibrated phenol ปริมาตร 650 µl ทำการ vortex แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 12,000 rpm นาน 3 นาที

2.2.5.16. เก็บ upper phase ปริมาตร 600 µl มาเติม chloroform ปริมาตร 600 µl ทำการ vortex แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 12,000 rpm นาน 3 นาที

2.2.5.17. เก็บ upper phase ปริมาตร 550 µl มาเติม chloroform ปริมาตร 550 µl ทำการ vortex แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 12,000 rpm นาน 3 นาที

2.2.5.18. เก็บ upper phase ปริมาตร 500 µl มาเติม chloroform ปริมาตร 500 µl ทำการ vortex แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 12,000 rpm นาน 3 นาที

2.2.5.19. เก็บ upper phase มาเติม 3 M Sodium acetate (pH 5.5) ปริมาตร 75 µl และ isopropanal ปริมาตร 500 µl พลิกหลอดไปมาเบา ๆ จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ – 20 °C เป็นเวลา 10 นาที หรือไม่เกิน 24 ชั่วโมง

2.2.5.20. นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 12,000 rpm นาน 10 นาที

2.2.5.21. เท supernatant ทิ้ง จากนั้นนำตะกอน DNA ที่ตกตะกอนไปล้างด้วย 70 % EtOH ปริมาตร 800 µl แล้วทำการ vortex

2.2.5.22. นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 12,000 rpm นาน 5 นาที

2.2.4.23. เท supernatant ทิ้ง จากนั้นนำตะกอน DNA ไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 60 นาที

2.2.5.24. ละลาย DNA ที่ได้ในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 50 µl

2.2.5.25. คำนวนหาปริมาณ DNA ที่สกัดได้ โดยทำการวัดค่า OD ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 nm โดยใช้ DNA ปริมาตร 2 µl แล้วเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 98 µl (เจือจาง 50 เท่า) (ถ้า OD เท่ากับ 1 จะมี DNA ประมาณ 50 µg/ ml (หรือ 50 ng/ µl))

2.3. ผลของขนาดพอลิเมอร์และความเข้มข้นของไคโตซานต่อการกัดกินของหนอนกระทู้หอมในกระเจี๊ยบเขียว และปริมาณ Proteinase inhibitor

2.3.1. วางแผนการทดลองเพื่อเปรียบเทียบผลของไคโตซาน 3 ชนิดคือ P80 O80 และ UCC ต่อปริมาณ proteinase inhibitor และการกัดกินของหนอนกระทู้หอมในกระเจี๊ยบเขียวพันธุ์ญี่ปุ่น Yamato Green

ดังนั้นจึงวางแผนการทดลองแบบ CRD มีชุดการทดลองเป็น 3+1(ชุดควบคุม) แต่ละชุดการทดลองมีจำนวนซ้ำ 4 ซ้ำ โดยปลูกกระเจี๊ยบเขียวในกระถางพลาสติกสีดำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 11.0 นิ้ว จำนวน 1 ต้นต่อกระถาง ซ้ำละ 6 กระถาง

2.3.2. ทำการปลูกกระเจี๊ยบเขียวเป็นเวลา 9 สัปดาห์ โดยฉีดพ่นสารละลายไคโต-ซาน ที่ความเข้มข้น 50 ppm ให้ทั่วทั้งต้น ทุก 3 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างใบโดยการเจาะด้วยที่เจาะกระดาษที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางรอยเจาะ 0.5 เซนติเมตร ก่อนการฉีดพ่นสารละลายไคโตซาน 1 วันและในวันที่ 1 5 9 13 17 และ 21 วัน หลังการฉีดพ่นสารละลายไคโตซานแต่ละครั้ง เพื่อนำมาใช้

ในการวัด Proteinase inhibitor activity โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Stout และคณะ (1998) และตรวจสอบการกัดกินใบกระเจี๊ยบเขียวของหนอนกระทู้หอมโดยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Underwood และคณะ (2000)

2.3.3. ทำการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 2.3.1 - 2.3.2 แต่เปลี่ยนพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวเป็นพันธุ์อินเดีย 9701

2.3.4. วิธีวัดการกัดกินของหนอนกระทู้หอม **(ดัดแปลงจากวิธีของ Underwood et al., 2000)**

2.3.4.1. ทำการเจาะใบกระเจี๊ยบเขียวด้วยเครื่องเจาะใบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 cm จำนวนชุดการทดลองละ 50 ชิ้น แยกใส่กล่องพลาสติกที่มีฝาปิด แล้วแช่ในถังน้ำแข็ง

2.3.4.2. ทำการชั่งชิ้นใบกระเจี๊ยบเขียวที่เจาะมาด้วยเครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง เพื่อหาน้ำหนักสดเฉลี่ยของแต่ละชิ้นใบที่เจาะมา โดยชั่งทีละ 10 ชิ้น

2.3.4.3. คีบใบกระเจี๊ยบเขียว 1 ชิ้นใส่ถ้วยพลาสติกที่มีกระดาษกรองอิ่มน้ำรองอยู่ โดยทำทั้งสิ้น 4 ชุดการทดลอง การทดลองละ 4 ซ้ำ

2.3.4.4. นำหนอนกระทู้หอมที่ผ่านการคัดเลือกขนาด และอายุ (วัย 2) ที่ใกล้เคียงกัน ใส่ลงในถ้วยที่มีชิ้นใบกระเจี๊ยบเขียว 1 ตัว ต่อ 1 ชิ้นใบ ต่อ ถ้วย

2.3.4.5. ปล่อยให้หนอนกินชิ้นใบพืชเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำหนอนออกจากถ้วยทดลอง

2.3.4.6. รวมชิ้นใบพืชทั้ง 10 ชิ้น ชั่งน้ำหนักเพื่อหาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักชิ้นใบกระเจี๊ยบเขียวที่เหลือ เพื่อหาน้ำหนักของชิ้นใบพืชที่หายไป เนื่องจากถูกหนอนกัดกิน

2.3.4.7. คำนวนปริมาณเนื้อเยื่อใบที่ถูกกัดกินไป ด้วยการเปรียบเทียบกับน้ำหนักสดที่ลดลง โดยใช้สูตร ปริมาณเนื้อเยื่อใบกระเจี๊ยบเขียวที่ถูกกัดกินด้วยหนอนกระทู้หอม

$$= \frac{(\text{น้ำหนักสดใบพืชก่อนถูกกัดกิน (g)} - \text{น้ำหนักของชิ้นใบพืชที่เหลือหลังถูกกัดกิน (g)}) \times 100}{\text{น้ำหนักใบพืชก่อนถูกกัดกิน (g)}}$$

2.3.5. Proteinase inhibitor (PI) activity **(ดัดแปลงจากวิธีของ Stout et al., 1998)**

2.3.5.1. นำตัวอย่างใบกระเจี๊ยบเขียวน้ำหนักประมาณ 1 กรัม ซึ่งเก็บที่ – 70 °C มาทำการบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลวโดยใช้โกร่งที่เย็นและผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 180 °C 3 ชั่วโมง

2.3.5.2. เติม Extraction Buffer ปริมาตร 3 ml จากนั้นคนให้เข้ากันเทใส่หลอด eppendrof แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที

2.3.5.3. นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 11,000 rpm นาน 10 นาที

2.3.5.4. เก็บ Supernatant แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที

2.3.5.5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 11,000 rpm นาน 2 นาที

2.3.5.6. เก็บ Supernatant แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที หรือเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นตลอดเวลาก่อนนำไปทำการวัดปริมาณ PI ต่อไป

2.3.5.7. ดูดสารสกัดจากใบกระเจี๊ยบเขียวปริมาตร 25 µl จากนั้นเติม Chymotrypsin ใน 0.001 M HCl Solution ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.0015 mg/ml

2.3.5.8. บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที

2.3.5.9. เติม BTEE ซึ่งละลายอยู่ใน methanol และ Phosphate buffer (pH8) ที่อัตราส่วน 12:13 (v/v) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 mM

2.3.5.10. นำไปวัดอัตราการเกิดปฏิกิริยาโดยการวัดการดูดกลืนด้วยแสงที่ความยาวคลื่น 256 nm โดยใช้โปรแกรม kinetics แล้วคิดเปอร์เซ็น Proteinase inhibitor activity (%)

2.3.5.11. คำนวนหาเปอร์เซ็น PI activity โดยเปรียบ เทียบกับค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ได้จากหลอดการทดลองที่เป็นชุดปฏิกิริยาควบคุม ซึ่งใส่ Plant Extraction Buffer แทนสารสกัดจากใบกระเจี๊ยบเขียว

โดยคำนวน % PI activity จากสูตร

$$\% \text{ Proteinase inhibitor activity} = [(X - Y) / X] \times 100$$

X = ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดปฏิกิริยาควบคุม

Y = ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดปฏิกิริยาตัวอย่าง

2.3.5.12. คำนวณปริมาณ PI ในแต่ละตัวอย่างเป็น µg โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ PI บริสุทธิ์

2.3.5.13. คำนวณค่าปริมาณ PI จำเพาะโดยนำค่าปริมาณ PI (µg) ที่ได้มาหารด้วยค่าปริมาณ total protein (mg) ที่วัดได้จากแต่ละตัวอย่าง