ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนหนอนกระทู้ผักตลอดฤดู

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
T (A)	7	56.9688	8.13839	0.77	0.6191
R (B)	3	9.09375	3.03125	0.29	0.8346
A*B	21	222.156	10.5789		
TOTAL	31	288.219			

ตารางภาคผนวกที่ 2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของด้วงหมัดผักตลอดฤดู

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
T (A)	7	2109.47	301.353	1.60	0.1909
R (B)	3	3907.09	1302.36	6.90	0.0021
A*B	21	3962.16	188.674		
TOTAL	31	9978.72			

ตารางภาคผนวกที่ 3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเพลี้ยอ่อนผักตลอดฤดู

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
T (A)	7	80281.4	11468.8	1.13	0.3841
R (B)	3	45683.1	15227.7	1.50	0.2447
A*B	21	213823	10182.1		
TOTAL	31	339788			

ตารางภาคผนวกที่ 4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสูงคะน้าอายุ 30 วันหลังจากเพาะเมล็ด

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
T (A)	7	2.38056	0.34008	0.56	0.7766
R (B)	3	1.85717	0.61906	1.03	0.4010
A*B	21	12.6660	0.60314		
TOTAL	31	16.9037			

ตารางภาคผนวกที่ 5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสูงคะน้าอายุ 37 วันหลังจากเพาะเมล็ด

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
T (A)	7	9.62900	1.37557	0.55	0.7890
R (B)	3	4.96274	1.65425	0.66	0.5868
A*B	21	52.7655	2.51264		
TOTAL	31	67.3573			

ตารางภาคผนวกที่ 6 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสูงคะน้าอายุ 44 วันหลังจากเพาะเมล็ด

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
T (A)	7	19.6816	2.81165	0.87	0.5468
R (B)	3	8.71462	2.90487	0.90	0.4591
A*B	21	68.0042	3.23829		
TOTAL	31	96.4003			

ตารางภาคผนวกที่ 7 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสูงคะน้าอายุ 51 วันหลังจากเพาะเมล็ด

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
T (A)	7	84.5130	12.0733	1.96	0.1096
R (B)	3	42.8994	14.2998	2.32	0.1041
A*B	21	129.161	6.15053		
TOTAL	31	256.573			

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางภาคผนวกที่ 8 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสูงคะน้าอายุ 58 วันหลังจากเพาะเมล็ด

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
T (A)	7	25.5300	3.64714	0.38	0.9033
R (B)	3	34.2736	11.4245	1.19	0.3367
A*B	21	201.193	9.58060		
TOTAL	31	260.996			

ตารางภาคผนวกที่ 9 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของพื้นที่ใบคะน้าเมื่ออายุ 65 วันหลังจากเพาะเมล็ด

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
T (A)	7	1900.19	271.455	0.89	0.5282
R (B)	3	74.8573	24.9524	0.08	0.9690
A*B	21	6370.87	303.375		
TOTAL	31	8345.91			

ตารางภาคผนวกที่ 10 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนใบคะน้าเมื่ออายุ 65 วันหลังจากเพาะเมล็ด

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
T (A)	7	5.87500	0.83929	0.74	0.6426
R (B)	3	1.12500	0.37500	0.33	0.8038
A*B	21	23.8750	1.13690		
TOTAL	31	30.8750			

ตารางภาคผนวกที่ 11 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักสดส่วนเหนือดินคะน้าเมื่ออายุ 65 วันหลังจากเพาะเมล็ด

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
T (A)	7	1934.99	276.427	0.73	0.6474
R (B)	3	4881.32	1627.11	4.31	0.0162
A*B	21	7930.42	377.639		
TOTAL	31	14746.7			

ตารางภาคผนวกที่ 12 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักสดรากคะน้าเมื่ออายุ 65 วันหลังจากเพาะเมล็ด

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
T (A)	7	8.30697	1.18671	0.59	0.7605
R (B)	3	3.87456	1.29152	0.64	0.5997
A*B	21	42.5947	2.02832		
TOTAL	31	54.7762			

ตารางภาคผนวกที่ 13 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักสดส่วนที่บริโภคได้ของคะน้าเมื่ออายุ 65 วันหลังจากเพาะเมล็ด

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
T (A)	7	898.239	128.320	0.63	0.7227
R (B)	3	1880.63	626.875	3.10	0.0488
A*B	21	4249.46	202.355		
TOTAL	31	7028.33			

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางภาคผนวกที่ 14 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักแห้งส่วนเหนือดินคะน้าเมื่ออายุ 65 วันหลังจากเพาะเมล็ด

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
T (A)	7	14.5627	2.08039	2.92	0.0267
R (B)	3	8.29184	2.76395	3.88	0.0236
A*B	21	14.9558	0.71218		
TOTAL	31	37.8104			

ตารางภาคผนวกที่ 15 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักแห้งรากคะน้าเมื่ออายุ 65 วันหลังจากเพาะเมล็ด

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
T (A)	7	8.14601	1.16372	3.65	0.0099
R (B)	3	0.15148	0.05049	0.16	0.9232
A*B	21	6.70147	0.31912		
TOTAL	31	14.9990			

ตารางภาคผนวกที่ 16 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของสัดส่วนระหว่างน้ำหนักแห้งส่วนและจากคะน้าเหนือดินคะน้าเมื่ออายุ 65 วันหลังจากเพาะเมล็ด

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
T (A)	7	545.312	77.9017	3.03	0.0229
R (B)	3	96.8628	32.2876	1.26	0.3147
A*B	21	539.567	25.6936		
TOTAL	31	1181.74			

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางภาคผนวกที่ 17 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของใบคะน้าเมื่ออายุ 52 วันหลังจากเพาะเมล็ด

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
T (A)	7	0.05006	0.00715	0.89	0.5298
R (B)	3	0.00946	0.00315	0.39	0.7590
A*B	21	0.16827	0.00801		
TOTAL	31	0.22779			

ตารางภาคผนวกที่ 18 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณคลอโรฟิลล์ บี ของใบคะน้าเมื่ออายุ 52 วันหลังจากเพาะเมล็ด

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
T (A)	7	0.01176	0.00168	0.71	0.6610
R (B)	3	0.00365	0.00122	0.52	0.6754
A*B	21	0.04941	0.00235		
TOTAL	31	0.06482			

ตารางภาคผนวกที่ 19 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณ total nonstructural carbohydrate ในใบคะน้าเมื่ออายุ 65 วันหลังเพาะเมล็ด

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
T (A)	7	8.40769	1.20110	10.29	0.0000
R (B)	3	1.03641	0.34547	2.96	0.0557
A*B	21	2.45149	0.11674		
TOTAL	31	11.8956			

ตารางภาคผนวกที่ 20 เปอร์เซ็นต์ต้นคะน้าที่พบลักษณะผิดปกติ

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
T (A)	7	4663.45	666.207	3.52	0.0117
R (B)	3	2321.06	773.687	4.09	0.0196
A*B	21	3970.70	189.081		
TOTAL	31	10955.2			

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

เครื่องวัดการเปิด-ปิดของปากใบ Porometer AP-4 ของบริษัท DELTA-T DEVICE Cambridge-UK.)

เครื่องวัดค่าความต้านทานปากใบของพืชประกอบด้วยส่วนประกอบหลัก อยู่ 2 ส่วนคือ หัววัด (sensor head) และตัวเครื่องซึ่งเป็นตัวดูดอากาศจากภายนอก หัววัดเป็นอุปกรณ์ที่มีความสำคัญมากของเครื่องวัดการเปิด-ปิดของปากใบ เป็นส่วนประกอบที่สัมผัสกับพืชโดยตรง ประกอบด้วยอุปกรณ์ที่ใช้ตรวจวัดค่าต่างๆ เช่น หัววัดอุณหภูมิ หัววัดความชื้นสัมพัทธ์ หัววัดความเข้มแสง และหัววัดอุณหภูมิกระเปาะ ในส่วนปลายของสายส่งสัญญาณจะมีสายนำสัญญาณเข้าสู่ตัวเครื่องรวมสองเส้น โดยสายหนึ่ง โดยตรงและอีกสายหนึ่งเป็นท่อนำอากาศเข้าสู่หลอดใส่สารดูดความชื้น ระหว่างการปฏิบัติงานต้องสำรวจให้ท่อนำอากาศต่อให้แน่นเข้ากับท่อบรรจุสารดูดความชื้น และส่วนประกอบที่สอง คือ

ก่อนการใช้เครื่องวัดการเปิด-ปิดของปากใบทุกครั้งต้องทำมาตรฐาน (calibration) ให้แก่เครื่องก่อน โดยวิธีการทำค่ามาตรฐานสำหรับการเปรียบเทียบมี ดังนี้

1) เตรียมแผ่นกระดาษกรองที่ใช้สำหรับการปรับเปรียบเทียบมาตรฐาน โดยใช้กระดาษกรองมีขนาดพอดีกับแผ่นปรับมาตรฐาน เปียกน้ำที่ซับน้ำออกด้วยกระดาษทิชชูจนหมาด แล้ววางไว้บนด้านหลังของ แผ่นปรับมาตรฐานแล้วปิดด้วยกระดาษกาวซึ่งขณะที่ปิดเทปกาวต้องไล่อากาศออกให้หมดก่อน แผ่นปรับมาตรฐานที่เตรียมเสร็จเรียบร้อยแล้ว ควรเก็บไว้ในถุงเก็บซึ่งมีซิบปิดสนิทเพื่อป้องกันการระเหยของน้ำออกจากแผ่นกระดาษกรองเร็วเกินไป อย่างไรก็ตามควรเตรียมใหม่แผ่นปรับมาตรฐานใหม่ทุกวันเมื่อต้องการใช้เครื่องวัดการเปิด-ปิดของปากใบ

2) การปรับมาตรฐานเครื่องวัดการเปิด-ปิดของปากใบ ก่อนเปิดเครื่องควรทำการตรวจสภาพความพร้อมของเครื่องก่อนใช้งาน ดังนี้

2.1) ตรวจสอบสภาพสารดูดความชื้นภายในหลอดดูดความชื้นให้มีสภาพแห้ง ไม่จับตัวกันเป็นก้อน

2.2) กดปุ่ม ON ปรับความคมชัดของจอด้วยปุ่ม LCD ตรวจขนาดความจุของแบตเตอรี่ จากนั้นตรวจขนาดความจำของเครื่องหากมีขนาดความจำเหลือน้อยให้ทำการลบข้อมูลที่ไม่ใช้ หรือส่งข้อมูลออกสู่คอมพิวเตอร์หรือเครื่องพิมพ์

ในขั้นตอนการปรับมาตรฐานของเครื่องวัดการเปิด-ปิดของปากใบเมื่อเปิดเครื่องที่จอภาพจะปรากฏเมนูหลักให้ใช้ปุ่มลูกศรเลื่อนแถบสีไปที่ตำแหน่ง calibration แล้วกดปุ่ม Go จากนั้นสอดแผ่นปรับมาตรฐานที่ตำแหน่งที่หนึ่ง ใช้ปุ่มลูกศรเลื่อนแถบสีไปที่ตำแหน่ง Start แล้วกดปุ่ม Go เครื่องจะดูดอากาศจากภายนอกเข้ามาเป็นช่วงๆ ให้สังเกตค่าที่ปรากฏบนหน้าจอให้มีค่าใกล้เคียงกันโดยจะมีสัญญาณดังขึ้น แสดงว่าเป็นค่าที่สามารถยอมรับได้ เมื่อตัวเลขเป็นที่น่าพอใจให้กดปุ่ม Go เพื่อบันทึกค่าดังกล่าวเข้าสู่เครื่อง หลังจากนั้นเครื่องจะเตรียมพร้อมสำหรับการสอดแผ่นมาตรฐานตำแหน่งที่สอง เมื่อเปลี่ยนตำแหน่งของแผ่นปรับมาตรฐานมาที่ตำแหน่งที่สอง แล้วให้ดำเนินการเช่นเดียวกับตำแหน่งที่หนึ่ง จนกระทั่งถึงตำแหน่งที่สี่ จะปรากฏตัวเลือก fit curve และ cycle ซึ่งถ้าค่าที่อ่านได้มีค่าใกล้เคียงกันก็สามารถเลือก fit curve แต่ถ้าต้องการทำต่อไปให้เลือก cycle แล้วทำจนถึงตำแหน่งที่หกของแผ่นปรับมาตรฐาน หลังจากปรับมาตรฐานจนถึงตำแหน่งที่หกแล้วจะปรากฏผล curve error แสดงบนจอแสดงผลค่าความผิดพลาดควรอยู่ที่ระดับ 5 เปอร์เซ็นต์ จึงจะสามารถยอมรับข้อมูลเข้าสู่หน่วยความจำของเครื่อง หากค่าความผิดพลาดมีค่า 10-15 เปอร์เซ็นต์ ให้กดปุ่ม Redo เพื่อทำการปรับมาตรฐานใหม่

3) การวัดค่าการเปิด-ปิดของปากใบพืช

เมื่อเปิดเครื่องที่หน้าจอจะแสดงเมนูหลักเลื่อนแถบสีไปยังตำแหน่ง Read นำหัววัดไปหนีบไว้บนใบที่ต้องการวัดค่าการเปิด-ปิดของปากใบแล้วกดปุ่ม Go จนกระทั่งมีเสียง สัญญาณดังขึ้น แสดงว่าค่าที่ปรากฏขึ้นมีค่าใกล้เคียงกันและสามารถยอมรับได้ กล่าวคือ มีค่าความผิดพลาดไม่เกิน 2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อกดปุ่ม Go เพื่อยอมรับ จะเข้าสู่การบันทึกข้อมูลสู่หน่วยความจำของเครื่อง หน่วยของค่าที่วัดได้สามารถเลือกได้ว่าจะให้วัดเป็นค่า ความต้านทานของปากใบ (resistance) หน่วยเป็น s . cm^{-1} หรือค่า conductance

การตรวจวัดปริมาณคลอโรฟิลล์

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์และเครื่องแก้วได้แก่

1) โกร่งบดพร้อมสาก
2) ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
3) กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
4) กระบอกตวงขนาด 10 มิลลิลิตร
5) ขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร
6) สารเคมี ได้แก่ Acetone 80 %

ศึกษาหาปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบดัดแปลงจากวิธีของ Whitham *et al.* (1971) โดยนำใบคะน้ามาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ คลุกเคล้าให้เข้ากัน นำไปบดให้ละเอียดในโกร่ง แล้วสุ่มตัวอย่างมา 1 กรัม เติมอะซีโตน 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 10 มิลลิลิตรแล้วบดต่อ 1-2 นาที นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 พร้อมทั้งล้างเศษที่ติดอยู่ในโกร่งบดด้วยอะซิโตน 80 เปอร์เซ็นต์ 2-3 ครั้ง จนไม่มีรงควัตถุติดอยู่กับกาก จากนั้นปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 25 มิลลิลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 645 และ 663 นาโนเมตร โดยใช้อะซิโตน 80 เปอร์เซ็นต์ เป็น blank จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ดังสูตร โดยมีหน่วยเป็น มิลลิกรัมของคลอโรฟิลล์ต่อกรัมน้ำหนักใบ

$$\text{คลอโรฟิลล์เอ} = [12.7\ D663 - 2.69 D645]V\ /\ 1{,}000 \times W$$

$$\text{คลอโรฟิลล์บี} = [22.9\ D645 - 4.68 D663]V\ /\ 1{,}000 \times W$$

D(645) = ค่า optical density ที่วัดได้โดยใช้ความยาวคลื่นแสง 645 นาโนเมตร

D(663) = ค่า optical density ที่วัดได้โดยใช้ความยาวคลื่นแสง 663 นาโนเมตร

W = น้ำหนักตัวอย่างใบ(กรัม)

V = ปริมาตรอะซีโตนที่คลอโรฟิลล์ละลายอยู่

การตรวจวัดปริมาณ total nonstructural carbohydrate (TNC)ในใบ

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์และเครื่องแก้ว มีดังนี้

1) ขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร
2) หลอดทดลองขนาด 25 x 250 มิลลิลิตร
3) ขวดปรับปริมาตร ขนาด 25 และ100 มิลลิลิตร
4) บีกเกอร์ขนาด 50, 250, และ1,000 มิลลิลิตร
5) บูเรตต์ขนาด 25 มิลลิลิตร
6) กระบอกตวงขนาด 10 และ 100 มิลลิลิตร
7) กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42
8) ตะแกรงขนาด 40 mesh

สารเคมี มีดังนี้

1) D-glucose
2) anhydrous sodium carbonate
3) sodium potassium tartrate
4) sodium bicarbonate
5) anhydrous sodium sulfate
6) copper sulfate
7) sulfuric acid
8) ammoniummolybdate
9) sodium dehydrogenasenate
10) น้ำกลั่น

ตรวจวัดปริมาณ TNC ในใบโดยสุ่มเก็บใบคะน้า นำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ คลุกเคล้าให้เข้ากัน แล้วสุ่มตัวอย่างมาหาปริมาณ TNC ตามวิธีของ Hodge and Hofreiter (1962) ที่ดัดแปลงโดย สุจริต (2531) โดยมีวิธีเตรียมสารเคมีและการวิเคราะห์ดังนี้

1) การเตรียมสารเคมี

1.1) Nelson's reagent A

ละลาย anhydrous sodium carbonate และ sodium potassium tartrate ชนิดละ 25 กรัม ผสมกับ sodium bicarbonate และ anhydrous sodium sulfate ชนิดละ 25 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

1.2.) Nelson's reagent B

ละลาย copper sulfate 15 กรัมลงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เติม กรด sulfuric 2 หยด แล้วคนจนละลาย

1.3) Nelson's alkaline copper reagent

ในการใช้แต่ละครั้งควรเตรียมใหม่ และเตรียมให้พอดีสำหรับการใช้แต่ละครั้งเท่านั้น โดยนำสารละลาย Nelson's reagent A ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ผสมกับ Nelson's reagent B ปริมาณ 0.8 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากัน

1.4) arsenomolybolic acid reagent

ละลาย ammoniummolybolic ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) ปริมาณ 25 กรัมในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร เติมกรด sulfuric เข้มข้น 21 มิลลิลิตร และ ละลาย sodium dehydrogenarsenate($Na_2HAr.7H_2O$) 3 กรัมในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลาย sodium dehydrogenarsenate ผสมในสารละลาย ammoniummolybolic เขย่าให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 วัน ก่อนนำมาใช้ สารละลายที่ใช้ได้ต้องมีสีเหลืองอ่อนเท่านั้น

2.) การสกัด total nonstructural carbohydrate(TNC) จากตัวอย่างพืช

โดยใช้วิธี acid extraction ตาม วิธีของ Smith *et al.* (1964) อ้างโดย สุจริต (2531) ซึ่งมีวิธีการ คือ นำตัวอย่างพืชอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง มาบดและร่อนผ่านตระแกรง 40 mesh เก็บไว้ในโถดูดความชื้นเมื่อต้องการนำมาใช้ นำไปอบที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บไว้ในโถดูดความชื้นก่อนนำไปชั่งน้ำหนัก 0.05 กรัมใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม 0.2 N H_2SO_4 ปริมาณ 40 มิลลิลิตร ปิดด้วยแผ่นอะลูมิเนียม แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที จากนั้นนำไปวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย NaOH และปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42 บรรจุเก็บไว้ในขวด 100 มิลลิลิตร เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

3) การวิเคราะห์หาปริมาณ total nonstructural carbohydrate(TNC)

การวิเคราะห์หาปริมาณ TNC โดยวิธี Nelson 's reducing procedure ตามวิธีของ Hodge and Hofreiter (1962) ที่ดัดแปลงโดย สุจริต (2531) ซึ่งใช้วิธีการเปรียบเทียบเป็นปริมาณน้ำตาล (มิลลิกรัมของ D-glucose) ในการวิเคราะห์ใช้สารละลาย D-glucose (equivalent) ตั้งแต่ 0.00-0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร เติม Nelson ' s alkaline copper reagent 1 มิลลิลิตร เขย่า และปิดด้วยแผ่นอะลูมิเนียม นำไปวางในน้ำเดือดนาน 20 นาที จากนั้นนำไปวางในน้ำเย็น เมื่อหลอดทดลองเย็นลงให้เติมสารละลาย arsenomolybolic acid reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ตะกอนละลายแล้วเติมน้ำกลั่น 7 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่า absorbent (%A) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer จากนั้นนำมาเป็นกราฟมาตรฐาน การวิเคราะห์หาปริมาณ TNC ทำเช่นเดียวกันใช้สารสกัดจากตัวอย่างพืชแทน และนำค่า OD ที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณคาร์โบไฮเดรต

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์ มีดังนี้

1) ขวดสำหรับใส่น้ำยาเคมี และเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อพืช
2) ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ระดับอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส
3) เครื่องตัดเนื้อเยื่อพืชแบบล้อหมุน(rotary microtome)
4) แท่งไม้ขนาดประมาณ 3.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร
5) แผ่นสไลด์พร้อมแผ่นปิดสไลด์
6) แผ่นความร้อนสำหรับอุ่นสไลด์
7) ขวดแก้วสำหรับย้อมสีเนื้อเยื่อ
8) กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์การถ่ายภาพ
9) ตะเกียงแอลกอฮอล์ เข็มเขี่ย และใบมีดโกน

สารเคมี มีดังนี้

1) น้ำยาสำหรับฆ่าและรักษาสภาพเซลล์ (killing and fixing solution) คือน้ำยา FAA (formalin acetic acid alcohol) ซึ่งประกอบด้วยสารเคมีในอัตราส่วน ดังต่อไปนี้

Ethyl alcohol 95 %	50	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	5	มิลลิลิตร
Formalin	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	35	มิลลิลิตร

2) น้ำยาสำหรับดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution)
น้ำยามีส่วนผสมของ ethyl alcohol และ tertiary butyl alcohol (TBA) ในอัตราส่วนต่างๆ กัน ตั้งแต่ระดับ 50 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำยา ไปจนถึง 100 เปอร์เซ็นต์ของน้ำยา ดังแสดงส่วนผสมและอัตราส่วนผสมของอัตราส่วนของสารเคมีดังตารางภาคผนวกที่ 21

ตารางภาคผนวกที่ 21 ส่วนผสมและอัตราส่วนของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้สำหรับดึงน้ำออกจากเซลล์

สารเคมี(มิลลิตร)	อัตราส่วน				
	50 %	70 %	85 %	95 %	100 %
น้ำกลั่น	50	30	15	-	-
ethyl alcohol 95 %	40	50	50	45	-
TBA	10	20	35	55	75
absolute ethyl alcohol	-	-	-	-	25

3) สารตัวกลางที่ใช้สำหรับฝังเนื้อเยื่อเพื่อการตัด(embedding media) ได้แก่ paraplast

4) น้ำยายึดเนื้อเยื่อให้ติดบนแผ่นสไลด์(adhesive) ได้แก่ albumin จากไข่ขาว มีขั้นตอนดังนี้

1. ตีไข่ขาวจนข้น
2. ตักเอาฟองอากาศออก
3. นำไข่ขาวจากข้อ 2 ผสมกับน้ำกลั่นอัตราส่วน 1 ต่อ 50
4. นำสารละลายข้อ 3 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมกับ sodium bensoule 0.5-1 กรัม
5. กรองสารละลายข้อ 4 ด้วยสำสี
6. เก็บ stock ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส
7. เจือจางstock ด้วยน้ำกลั่น อัตราส่วน 1 ต่อ 50 เพื่อนำไปใช้ต่อไป

5) น้ำยาทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing reagent) ได้แก่ xylol

6) สีสังเคราะห์สำหรับย้อมเนื้อเยื่อ คือ Dalafield's hematoxylin ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสม ดังต่อๆนี้

aluminium sulfate [$A_{l_2}(SO_4)_3.16H_2O$]	400	มิลลิลิตร
hematoxylin	4	มิลลิลิตร
95 % ethyl alcohol	25	มิลลิลิตร
methyl alcohol	100	มิลลิลิตร
glycerol	100	มิลลิลิตร

7) สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นสไลด์ ได้แก่ canada balsam(merck)

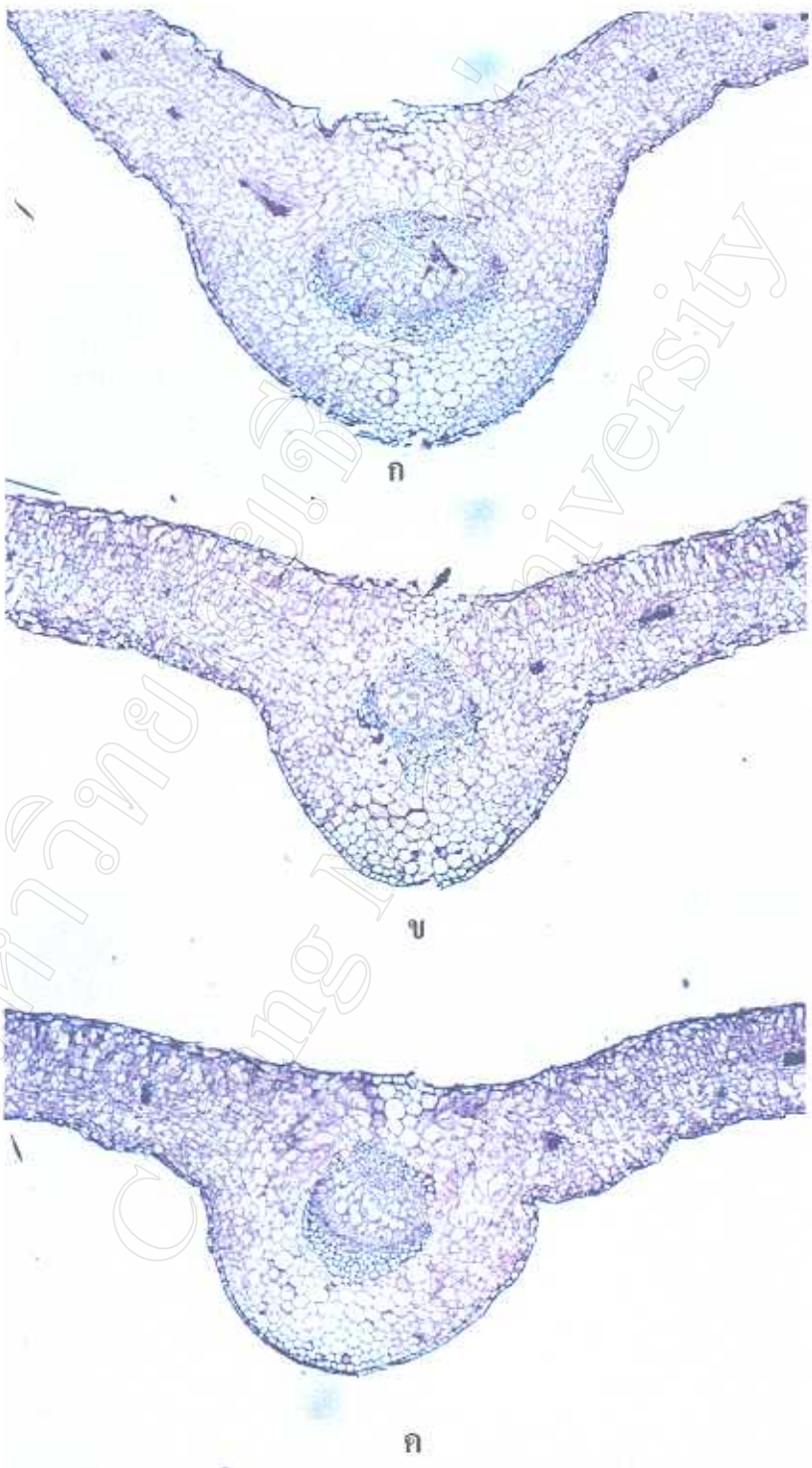
ขั้นตอน

1. การเก็บและการตัดตัวอย่าง นำส่วนใบคะน้ามาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1 x 1 เซนติเมตร โดยตัดเอาส่วนของใบที่มีเส้นกลางใบ
2. การฆ่าและรักษาสภาพเนื้อเยื่อ โดยนำชิ้นส่วนพืชข้อ 1 แช่ในน้ำยา FAA ให้ท่วมชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืช อย่างน้อย 1 สัปดาห์
3. การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ โดยนำชิ้นส่วนพืชข้อ 2 แช่ในน้ำยาสำหรับดึงน้ำออกจากเซลล์ ที่ระดับความเข้มข้นแอลกอฮอล์ 5 ระดับ คือ 50, 70, 85, 95, 100 เปอร์เซ็นต์ , pure TBA และ TBAผสมกับพาราฟินเหลวในอัตราส่วน 1:1 ตามลำดับ แต่ละระดับใช้ระยะเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นแอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์ ให้ผสมสี erythrosin ลงไปเล็กน้อย
4. นำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อข้อ 3 แช่ในพาราฟินแข็งที่หลอมแล้ว ที่อุณหภูมิ 58-60 องศาเซลเซียส โดยเริ่มอบจากพาราฟินเกรดต่ำก่อน แล้วค่อยเปลี่ยนเป็นพาราฟินเกรดดี โดยเปลี่ยน 3-4 ครั้ง สำหรับครั้งสุดท้ายใช้พาราฟินบริสุทธิ์(paraplast) โดยอบไว้อย่างน้อย 1 สัปดาห์
5. การฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน (embedding paraplast) ใช้กระดาษพับเป็นกระทง เท paraplast ที่หลอมไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มาแล้ว ไม่ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง ลงไปเกือบเต็มกระทง รอให้ส่วนล่างของ paraplast เย็นตัว ใช้เข็มเขี่ยที่หักส่วนปลายเป็นมุมฉากลนไฟจนร้อนจัดปาดผิวหน้าของ paraplast ให้เหลว จากนั้นนำชิ้นส่วนพืชในข้อ 4 ที่อยู่ในตู้อบเทใส่กระทง พร้อมใช้เข็มเขี่ยที่ร้อนจัดเรียงชิ้นส่วนพืชให้อยู่ในแนวที่ต้องการ และเป็นการไล่ฟองอากาศออกจาก paraplast ด้วย ทิ้งให้เย็น เมื่อ paraplast แข็งตัวดีแล้วนำไปตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมตามลักษณะของเนื้อเยื่อ
6. การตัดเนื้อเยื่อด้วย rotary microtome นำชิ้นส่วนพืชที่ฝังใน paraffin มาติดบนแท่งไม้ โดยใช้ paraplast เป็นตัวเชื่อม แล้วนำไปตัดด้วย rotary microtome ให้มีความหนาประมาณ 10-15 ไมครอน จะได้แถบparaffin(ribbon) ที่มีชิ้นส่วนพืชติดอยู่ และเลือกแถบที่มีความสมบรูณ์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์
7. นำแถบparaffin ที่เลือก ติดบนกระจกสไลด์ โดยหยดน้ำยา albumin 1-2 หยด ใช้พู่กันเกลี่ยและวางแถบ paraffin ลงบนแผ่นสไลด์ แล้วนำไปวางบนแผ่นความร้อนสำหรับอุ่นสไสล์ ปล่อยให้แห้ง 3-4 วัน ก่อนการย้อมสี

8. ขั้นตอนการย้อมสีมีดังนี้ ในแต่ละขั้นตอนใช้เวลาย้อมประมาณ 3-5 นาที

1)	ไซลีน	
2)	ไซลีน + เอทิลแอลกอฮอล์	1:1
3)	ไซลีน + เอทิลแอลกอฮอล์	1:1
4)	เอทิลแอลกอฮอล์	95 %
5)	เอทิลแอลกอฮอล์	70 %
6)	เอทิลแอลกอฮอล์	50 %
7)	เอทิลแอลกอฮอล์	30 %
8)	สี hematexylin	
9)	น้ำประปา	หลายครั้ง
10)	เอทิลแอลกอฮอล์	30 %
11)	เอทิลแอลกอฮอล์	50 %
12)	เอทิลแอลกอฮอล์	70 %
13)	เอทิลแอลกอฮอล์	95 %
14)	เอทิลแอลกอฮอล์	100 % + ไซลีน 1:1
15)	เอทิลแอลกอฮอล์	100 % + ไซลีน 1:1
16)	เอทิลแอลกอฮอล์	100 %

9. ปิดสไลด์ด้วย cover slip โดยใช้ canada balsum หรือ permount เป็นสารตัวกลางสำหรับปิดสไลด์
10. นำสไลด์ที่ได้ไปถ่ายรูปด้วยกล้อง stereo microscope ใช้ฟิล์มขนาด 35 มิลลิเมตร และกำลังขยายประมาณ 47 เท่าในการถ่ายภาพ แล้วนำภาพที่ได้มาเทียบกับขนาดสเกลของ stage micrometer ที่ถ่ายด้วยกำลังขยายเท่ากัน



ภาพผนวกที่ 1 ท่อน้ำ ท่ออาหาร ชั้นพาลิเสด และเซลล์ข้างเคียงของใบคะน้า ซึ่งได้รับการพ่นด้วยน้ำ(ก)น้ำรวมกับสารจับใบ(ข) และน้ำรวมกับเอธานอลและสารจับใบ(ค)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวรัตติยา นวลหล้า
วัน เดือน ปีเกิด	18 ธันวาคม 2517
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนวัฒโนทัยพายัพ เชียงใหม่ ปีการศึกษา 2531 สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนวัฒโนทัยพายัพ เชียงใหม่ ปีการศึกษา 2534 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2538
ทุนการศึกษา	ได้รับทุนคุณไพศาล ศรีจรัสจรรยา 2537-2539 ได้รับทุนราชกรีฑาสโมสร 2540-2541

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University