บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. วัสดุที่ใช้ในการทดลอง

<u>พืชทดลอง</u>

ใช้ต้นลิ้นจี่พันธุ์จักรพรรดิอายุ 3 ปี ที่ปลูกจากกิ่งตอนต้นแม่เดียวกัน จำนวน 18 ต้น ในกระถางซีเมนต์ทรงกระบอก ขนาดความจุ 100 ลิตร ใช้ทรายละเอียดเป็นวัสดุปลูก ให้สารอาหารในรูปของสารละลายซึ่งมีองค์ประกอบธาตุอาหารคือ Mg^{2+}, K^{+}, Ca^{2+},$H_2PO_4^{-}$, SO_4^{2-}, NO_3^{-} และ NH_4^{+} ความเข้มข้นของธาตุอาหารแต่ละชนิดเท่ากับ 5 meq/l ส่วนธาตุอาหารรองใช้ตามคำแนะนำของ Hoagland and Arnon (1952)

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1 กระถางปลูก เป็นกระถางซีเมนต์ทรงกระบอกความจุ 100 ลิตร ด้านล่างกระถางปิดสนิท มีรูระบายน้ำด้านล่างต่อกับถังบรรจุสารละลายธาตุอาหาร ความจุ 10 ลิตร ด้วย สายยาง ฝังกระถางบนดิน รองก้นกระถางด้วยตาข่ายไนลอน และแผ่นใยหิน เพื่อป้องกันทรายไหลและอุดตันรูระบายน้ำ ปิดฝากระถางด้วยกระเบื้องแผ่นเรียบ เพื่อป้องกันการรบกวนจากน้ำภายนอกระบบ

2.2 ตลับเมตร

2.3 เวอร์เนียคาลิปเปอร์

2.4 เครื่องชั่งไฟฟ้า

2.5 กระบอกตวง

2.6 ป้ายและไม้บรรทัด

วิธีการทดลอง

1. วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ **(completely randomized design)** จำนวน 6 ซ้ำแต่ละซ้ำใช้ต้นลิ้นจี่ 1 ต้น มี 3 กรรมวิธีคือ

ศึกษาผลของรูปแบบของการให้สารโปแตสเซียมคลอเรต 3 ความเข้มข้นคือ

กรรมวิธีที่ 1 ให้โปแตสเซียมคลอเรตในปริมาณ 0 สตล/ต้น

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

กรรมวิธีที่ 2 ให้โปแตสเซียมคลอเรตในปริมาณ 5,000 สตล/ต้น

กรรมวิธีที่ 3 ให้โปแตสเซียมคลอเรตในปริมาณ 10,000 สตล/ต้น

ทำการให้สารโปแตสเซียมคลอเรตในรูปสารละลายโดยราดรอบทรงพุ่ม 1 ครั้ง หลังจากนั้นเก็บข้อมูลทุกๆ 7 วัน ระยะเวลาที่ทำการทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2543 ถึงเดือนเมษายน 2544

2. สถานที่ทำการทดลอง

แปลงทดลองไม้ผล ภาควิชาพืชสวน และห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3. บันทึกผลการทดลอง

3.1. การเจริญเติบโตของลิ้นจี่

3.1.1 ขนาดความสูงของต้น วัดความสูงจากจุดที่กำหนด (ขอบกระถาง) ถึงส่วนที่สูงที่สุดของทรงพุ่ม

3.1.2 ความกว้างของทรงพุ่ม วัดส่วนที่กว้างที่สุดของทรงพุ่มเป็น 2 แนว ตั้งฉากกันแล้ว นำมาหาค่าเฉลี่ย

3.1.3 เส้นผ่าศูนย์กลางของลำต้น วัดจากส่วนของลำต้นในแนวระดับ ที่สูงจากรอยต่อระหว่างรากกับลำต้นขึ้นมา 5 เซนติเมตร แล้วทำเครื่องหมายเพื่อใช้ในการวัดที่เดียวกันในครั้งต่อไป โดยใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์

ข้อมูลการเจริญเติบโตจะทำการวัดและบันทึกสัปดาห์ละ 1 ครั้ง นำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยทุกสัปดาห์ บันทึกผลการทดลอง 5 สัปดาห์ และในระดับความเข้มข้นที่ได้รับสารโปแตสเซียมคลอเรต และนำมาหาการเจริญเติบโตเป็นร้อยละ ตามสูตรของ Shabana *et. al.* (1981) คือ

$$R = \frac{(Xt - Xo) \times 100}{Xo}$$

โดยที่ R = การเจริญเติบโตเป็นร้อยละ

Xt = ค่าการวัดครั้งหลัง

Xo = ค่าการวัดครั้งแรก

3.2 การเจริญเติบโตและการพัฒนาของยอดและใบ

3.2.1 การผลิช่อใบ ตรวจนับและผูกป้ายไว้ทุกๆครั้ง ที่มีการผลิใบและยอด โดยนับช่อที่ผลิทั้งหมดต่อต้น แล้วเทียบเป็นเปอร์เซนต์ของการผลิช่อใบ

3.2.2 ความยาวของช่อใบ โดยวัดจากฐานของรอยต่อของช่อเก่าถึงส่วนของปลายยอด นับจำนวนใบประกอบต่อช่อใบใหม่และใบย่อยต่อช่อใบใหม่

3.2.3 จำนวนช่อใบต่อกิ่งทั้งหมด

3.2.4 ช่วงห่างของการผลิช่อใหม่ในแต่ละครั้ง (วัน)

3.3 การเจริญเติบโตของช่อดอกและการวิเคราะห์คุณภาพผล (ถ้ามีการออกดอกติดผล)

3.3.1 นับจำนวนช่อดอกที่ผลิ ความยาวของช่อดอก และจำนวนช่อดอกต่อกิ่ง

3.3.2 อัตราส่วนของเพศดอก โดยนับจำนวนดอกเพศผู้ดอกตัวเมียและดอกสมบรูณ์เพศ แล้วนำมาหาอัตราส่วนเพศดอก ส่วนการติดผลตรวจนับจำนวนการติดผลในแต่ละช่อดอก

3.3.3 คุณภาพผลวัดเมื่อผลแก่เต็มที่ นำผลลิ้นจี่มาบันทึกข้อมูลทางกายภาพและส่วนประกอบทางเคมี น้ำหนักผล

4. การเปลี่ยนแปลงปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้าง (total nonstructural carbohydrate; TNC)

<u>การเก็บและเตรียมตัวอย่างพืช</u>

<u>ใบ</u> เก็บตัวอย่างใบลิ้นจี่ที่เจริญเต็มที่ ช่วงใบที่ 2-4 จากปลายยอด สุ่มเก็บกระจายทั่วต้น

<u>ยอด</u> ตัดยอดลิ้นจี่ระยะเพสลาดที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางที่โคนกิ่ง ประมาณ 0.3-0.4 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร ตัดใบทิ้งทั้งหมด

<u>ราก</u> เก็บรากอ่อนยาวประมาณ 5 เซนติเมตร วัดจากปลายรากโดยประมาณ

ล้างใบ, ยอด และราก ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นผึ่งให้แห้ง นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 65-70 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมงจนกระทั่งตัวอย่างพืชแห้ง พักให้เย็นในโถดูดความชื้น (desiccator) นำตัวอย่างพืชที่แห้งบดละเอียดด้วยเครื่องบด wiley mill จนละเอียดแล้วร่อนตัวอย่างผ่านตะแกรงขนาด 40 เมช (mesh) บรรจุซองกระดาษเก็บในโถดูดความชื้นจนกว่าจะทำการวิเคราะห์

ก่อนทำการวิเคราะห์นำตัวอย่างที่บดแล้วไปอบอีกครั้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง และทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น นำมาชั่งน้ำหนักแห้งเพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์ตัวอย่างพืช

การเปลี่ยนแปลงปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้าง (total nonstructural carbohydrate; TNC) ในใบ ยอด และรากลิ้นจี่

1. การสกัด ตามวิธีการของ Smith *et al.* (1964) ซึ่งดัดแปลงโดย Chaitrakulsup (1981) โดยชั่งตัวอย่างพืชที่แห้งสนิทและบดแล้ว 0.05 กรัม เติม 0.2 N H_2SO_4 40 มิลลิลิตร ปิดปากภาชนะด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ แล้วอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตั้งไว้ให้เย็นแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman NO. 1 ปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย 1.0 N NaOH และ 50%HCl แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ดูดสารละลายที่สกัดและเจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์หาปริมาณ TNC

2. การวิเคราะห์ปริมาณ TNC โดยวิธีของ Nelson นำสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้และสารละลายดี-กลูโคส เข้มข้น 0.00-0.04% (ทำเป็น standard) ใส่หลอดทดลองขนาด 25 x 200 มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Nelson's alkaline copper reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วปิดด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ นำไปแช่ water bath อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นนำไปทำให้เย็นแล้วเติมด้วยสารละลาย arsenomolibdic acid reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ตะกอนของ Cu_2O ที่เกิดขึ้นให้ละลายจนหมด ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำสารละลายที่ได้ไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) จากเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 nm. โดยใช้ค่า standard จากสารละลายดี-กลูโคส ซึ่งทราบความเข้มข้น แล้วเป็นตัวเปรียบเทียบ ผลที่ได้แสดงเป็นมิลลิกรัมดี-กลูโคส/กรัมน้ำหนักแห้ง

การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ TNC

1. Nelson's alkaline copper reagent

สารละลาย anhydrous sodium carbonate (Na_2CO_3) 25 กรัม ในน้ำ 250 มิลลิลิตร แล้วใส่ potasssium sodium tartrate ($C_4H_4KNO_6.4H_2O$) 12 กรัม แล้วใส่สารละลาย 10% copper sulfate 40 มิลลิลิตร (ใช้ $CuSO_4.5H_2O$ 4 กรัมละลายน้ำจนครบ 40 มิลลิลิตร) เติม sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) อีก 16 กรัม (สารละลาย I)

สารละลาย anhydrous sodium sulfate (Na_2SO_3) 180 กรัม ในน้ำ 500 มิลลิลิตร (สารละลาย II)

ผสมสารละลายที่ I และสารละลายที่ II แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร หลังจาก 1 สัปดาห์ กรองแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส

2. <u>Arsenomolibdic acid reagent</u>

สารละลาย ammonium molibdate ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) 50 กรัม ในน้ำ 900 มิลลิลิตรเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น (H_2SO_4) 42 มิลลิลิตร (สารละลาย III)

สารละลาย disodium hydrogen arsenate ($Na_2HAsO_4.7H_2O$) 6 กรัม ในน้ำ 50 มิลลิลิตร (สารละลาย IV)

ค่อยๆเติมสารละลาย IV ในสารละลาย III แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส

5. การวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์ โดยวัดปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บี ตามวิธีของ Whitham *et al.*(1971)

ใช้ใบสดที่อยู่ระหว่างข้อที่ 2-4 ของช่อใบอายุประมาณ 60 วัน หั่นเป็นชิ้นเล็กๆสุ่มตัวอย่าง 0.5 กรัม บดกับทรายบริสุทธิ์ในโกร่งบด สกัดด้วยอะซิโตน 80 เปอร์เซ็นต์ 10 มิลลิลิตร กรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ล้างเศษที่ติดโกร่งด้วยอะซิโตน 80 % 2-3 ครั้งจนไม่มีรงควัตถุติดอยู่กับกากปรับปริมาตรครั้งสุดท้ายเท่ากับ 25 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงความยาวคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร ใช้อะซิโตน 80 เปอร์เซ็นต์ เป็น blank นำค่าที่ได้คำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ โดยมีหน่วยเป็นมิลลิกรัมของคลอโรฟิลล์ต่อกรัมน้ำหนักสด

$$\text{คลอโรฟิลล์เอ} = (12.7\,A_{663} - 2.69\,A_{645})\,V / 1000 \times w$$

$$\text{คลอโรฟิลล์บี} = (22.9\,A_{645} - 4.68\,A_{663})\,V / 1000 \times w$$

โดยที่ A = ค่าดูดกลืนแสง
V = ปริมาตรสารละลายรงควัตถุ
W = น้ำหนักของใบสด

6. การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินในลิ้นจี่ที่ได้รับสารโปแตสเซียมคลอเรต

วิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินในยอดและรากโดยวิธี soybean hypocotyl bioassay (ดรุณี, 2539)

การเก็บตัวอย่าง

ยอด ตัดยอดลิ้นจี่ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางที่โคนกิ่ง ประมาณ 0.3-0.4 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตรจำนวนซ้ำละ 20 ยอด ตัดใบทิ้งทั้งหมด เก็บใส่ถุงพลาสติกแช่น้ำแข็ง จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการสกัดต่อไป

ราก เก็บรากอ่อน ยาวประมาณ 5 เซนติเมตร วัดจากปลายรากโดยประมาณ น้ำหนัก 30 กรัม เก็บใส่ถุงพลาสติกแช่น้ำแข็ง จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการสกัดต่อไป

การสกัด

นำตัวอย่างบดละเอียดโดยใช้เครื่องปั่น นำมาชั่งน้ำหนัก 20 กรัม ใส่ใน erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติม ethanol 80% 200 มิลลิลิตร ปิด flask ด้วยจุกยางและเขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 17 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 แล้วนำสารละลายที่ได้ไปลดปริมาตร โดยใช้เครื่องระเหยความดันต่ำ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนเหลือปริมาตรประมาณ 50 มิลลิลิตร ปรับ pH เท่ากับ 2.5 ด้วย HCl 6 N

การแยกส่วน

นำสารละลายที่ได้แยกส่วนด้วยกรวยแยก (separatory funnel) ใช้ ethyl acetate 1.5 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง 1 กรัม จากการสกัดใช้ตัวอย่างสด 20 กรัม แช่ใน ethanol 200 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้จนสารละลายแยกชั้น เก็บเอาส่วนที่อยู่ชั้นล่างไว้ซึ่งเป็นสารที่ละลายในน้ำ (water phase) ปริมาตรประมาณ 30 มิลลิลิตร นำไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

การทำบริสุทธิ์

- กำจัดสิ่งเจือปนและสารยับยั้งการเจริญเติบโต (inhibitor) โดยใช้ column chromatography
- นำสารละลาย water phase ผ่านลงใน column โดยใช้ burette ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ยาว 25 เซนติเมตร บรรจุ Dowex resin ใน burette สูงประมาณ 20 เซนติเมตร โดยจะต้องแช่ Dowex resin ในน้ำกลั่นให้ขยายตัวเต็มที่ก่อนที่จะบรรจุใน burette ใช้สำลีรองพื้น ล้าง column ด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นผ่าน water phase ลงใน column 10 มิลลิลิตร ควบคุมให้สารละลายหยดลงช้าๆ ระวังอย่าให้ Dowex resin แห้ง สารละลายที่ไหลออกมาให้ทิ้งไป จากนั้นเก็บสารละลายที่ถูก ชะด้วย NH_4OH 5N 20 มิลลิลิตร ตามด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ปริมาตรประมาณ 40 มิลลิลิตร จากนั้นล้าง column เพื่อผ่าน water phase ครั้งต่อไปด้วย HCL 2 N 20 มิลลิลิตร ตามด้วยน้ำกลั่นอย่างน้อย 100 มิลลิลิตร จึงผ่าน water phase ตามขั้นตอนจนหมด จากนั้นนำไปลดปริมาตรด้วยเครื่องระเหยความดันต่ำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เหลือปริมาตร 1 มิลลิลิตร

การทำกราฟมาตรฐาน

- คัดเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 5 นำไปแช่น้ำ คัดเอาเมล็ดที่จมน้ำมาใช้ คัดเมล็ดที่มีขนาดใกล้เคียงกันประมาณ 90 เมล็ด นำมาฆ่าเชื้อโดยใส่ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมี ethanol 75%

แช่เมล็ดเขย่าตลอดเวลา เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำเมล็ดไปแช่ในสารละลาย sodium hypochlorite 5.25% : น้ำ (1:9โดยปริมาตร) เขย่าตลอดเวลาเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างด้วยนำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 5 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที (ทำในสภาพปลอดเชื้อ)

- เตรียมอาหารวุ้นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ซึ่งมีส่วนประกอบของน้ำตาล (sucrose) 15 กรัม : วุ้นผง 4 กรัมต่อน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เทใส่หลอดทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.4 เซนติเมตร ยาว 15 เซนติเมตร หลอดละ 10 มิลลิลิตร ปิดปากหลอดทดลองด้วยพลาสติก polypropylene (PP) รัดด้วยยางแล้วใช้กระดาษขนาด 7.5×7.5 เซนติเมตร ปิดรัดด้วยยางอีกชั้นหนึ่ง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันประมาณ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที แล้วปล่อยให้ความดันลดลงจนเท่ากับภายนอกจึงเปิดหม้อนึ่ง

- นำเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 5 ที่แช่ไว้มาเพาะในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้น (ในสภาพปลอดเชื้อ) แล้วนำไปไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

<u>การหา Rf ที่มีกิจกรรมของปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินโดยวิธี soybean hypocotyl bioassay (SHB)</u>

- การทำ paper chromatography เตรียมแผ่น chromatogram โดยใช้กระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาด 9 x 28 เซนติเมตร ขีดเส้นที่จุดเริ่มต้นที่จะ stripe สารละลายด้วยดินสอดำห่างจากขอบล่าง 2 เซนติเมตร และจุดสุดท้ายที่สารละลายจะเคลื่อนที่ไปถึง นำสารละลายตัวอย่างที่ลดปริมาตรแล้วมา stripe ลงบนกระดาษ chromatogram โดยใช้ตัวอย่าง 300 ไมโครลิตร (เทียบเท่าตัวอย่างสด 6 กรัม) จำนวน 3 แผ่นทิ้งให้แทบสารแห้ง นำกระดาษ chromatogram แช่ใน mobile phase คือ isopropanol 99.7% : NH_4OH 25 % : H_2O = 10 :1 : 1 โดยให้แถบสารอยู่เหนือตัวทำละลาย ทิ้งไว้จนแถบสารละลายเคลื่อนที่ไปถึงระยะ solvent front (ใช้เวลาประมาณ 8-9 ชั่วโมง) แล้วนำออกผึ่งให้แห้งแบ่งแผ่น chromatogram เป็น Rf 0.1-1.0 (ซึ่งเป็นส่วนที่อยู่เหนือแถบสารจนถึงระยะ solvent front) โดยแบ่งออกเป็น 10 ส่วนเท่า ๆ กัน ส่วน Rf 0.0 จะอยู่ใต้แถบสาร

- เตรียมอาหารวุ้นสูตร Miller (1961) (ตาราง 1) ไม่เพิ่มไคเนตินนำชิ้น chromatogram ที่ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ในแต่ละ Rf ใส่ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วเทอาหารวุ้นที่เตรียมไว้ขวดละ 10 มิลลิลิตร ปิดปากขวดนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

- นำต้นถั่วเหลืองที่เพาะในสภาพปลอดเชื้อในที่มืดและมีอายุ 7 วัน ตัดส่วน hypocotyl แต่ละชิ้นยาว 2 มิลลิเมตร วางลงในขวดอาหารที่เตรียมไว้ขวดละ 6 ชิ้น วางให้แต่ละชิ้นห่างเท่าๆกัน ปิดปากขวดนำไปเลี้ยงในตู้ควบคุมสภาพแวดล้อม ที่มีความเข้มแสง 1000 lux อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 วัน นำชิ้นต้นถั่วเหลืองมาชั่งน้ำหนักสด (มิลลิกรัม /6 ชิ้น)

ตาราง 1 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยง hypocotyl สูตร Miller (1961)

สารเคมี	ความเข้มข้น (ส่วนต่อล้าน)
KH_2PO_4	300
KNO_3	1,000
NH_4NO_3	1,000
$Cu(NO_3)_2.3H_2O$	0.35
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	500
$MgSO_4.H_2O$	71.5
KCl	65.5
$MnSO_4.H_2O$	14.0
$(NH_4)_6.Mo_7O_2.4H_2O$	0.1
KI	0.75
$ZnSO_4.7H_2O$	3.8
H_3BO_3	31.6
Myoinositol	100
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine.HCl	0.2
Thiamine.HCl	0.2
Na_2EDTA	13.4
$FeSO_4.7H_2O$	9.9
Sucrose	30,000
Bacto agar	10,000
Naphthalene acetic acid	2.0
Kinetin	0.5

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

การหาปริมาณการเปลี่ยนแปลงสารคล้ายไซโตไคนินโดยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay (SHB)

- การทำ paper chromatography ทำลักษณะเดียวกับการหา Rf

- แบ่งแผ่น chromatogram เป็น Rf 0.1-1.0 (ซึ่งเป็นส่วนที่อยู่เหนือแถบสารจนถึงระยะ solvent front) โดยแบ่งออกเป็น 10 ส่วนเท่า ๆ กัน ส่วน Rf 0.0 จะอยู่ใต้แถบสาร ตัดเฉพาะ Rf 0.1 และ 0.6-0.9 ซึ่งเป็น Rf ที่พบ activity มาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ในขวดอาหารวุ้นที่เตรียมไว้

- นำต้นถั่วเหลืองที่เพาะในสภาพปลอดเชื้อในที่มืดและมีอายุ 7 วัน ตัดส่วน hypocotyl แต่ละชิ้นยาว 2 มิลลิเมตร วางลงในขวดอาหารที่เตรียมไว้ขวดละ 6 ชิ้น วางให้แต่ละชิ้นห่างเท่าๆกัน ปิดปากขวด นำไปเลี้ยงในตู้ควบคุมสภาพแวดล้อม ที่มีความเข้มแสง 1000 lux อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 วัน นำชิ้นต้นถั่วเหลืองมาชั่งน้ำหนักสด (มิลลิกรัม /6 ชิ้น)

- <u>การทำ standard curve</u>

เตรียมอาหารวุ้นสูตร Miller (1961) โดยให้มีความเข้มข้นของไคเนติน 5×10^{-1}, 5×10^{-3}, 5×10^{-5}, 5×10^{-7} และ 5×10^{-9} มิลลิกรัม/ลิตร ใส่ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขวดละ 10 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 10 ขวด ปิดปากขวดนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ตัดส่วน hypocotyl เลี้ยงในอาหารเช่นเดียวกับขั้นตอนการทำ bioassay

- เทียบหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน จากกราฟมาตรฐานมีหน่วยเป็น μg kinetin equivalent/ g f.wt

- วิธีการคำนวณปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน

น้ำหนักตัวอย่าง 20 กรัม ได้สารสกัด 1 มิลลิลิตร (1 มิลลิลิตร = 1,000 ไมโครลิตร)

ถ้าใช้สาร 300 ไมโครลิตรได้จาก $20 \times 300 / 1,000 = 6$ กรัม

เมื่อใช้สาร 300 μl จากสมการเส้นตรงที่คำนวณได้จาก linear regression analysis ของ standard curve

$$Y = 1.6529X - 0.3325$$

โดยที่ Y = ความเข้มข้นของ kinetin (มก/ล)

X = น้ำหนักสดของ hypocotyl (มก)

ค่า Y ทำให้ทราบว่าในสารละลาย 1,000 มล มีปริมาณ kinetin อยู่ = Y มก.

ดังนั้นในอาหารวุ้น 10 มล มีปริมาณสารคล้ายไซโตไนิน = $Y \times 10 / 1,000$ มก.

จากน้ำหนักตัวอย่าง 6 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน = $Y \times 10 / 1,000$ มก.

น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน = $Y / 600$ มก.

การเปลี่ยนหน่วยของสารคล้ายไซโตไคนินาก มก เป็น μg มก ทำโดยคูณด้วย 1,000

ดังนั้นตัวอย่าง 1 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน = $Y \times 10 / 6$ μg

- วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม SPSS โดยวิเคราะห์ test of AOV assumption ,AOV,CV.,LSD, linear regression และ correlation