# บทที่ 3
# อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

## 1. การเปลี่ยนแปลงปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้างในช่วงก่อนการออกดอกของยอดลำไยพันธุ์ดอที่ได้รับสารโพแทสเซียมคลอเรต

### การวางแผนการทดลอง

การวางแผนทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 4×6 กรรมวิธี ทำ 3 ซ้ำ ปัจจัยที่ 1 คือสารโพแทสเซียมคลอเรตจำนวน 4 ระดับ ได้แก่ 0 , 200 , 500 และ 800 กรัม/ต้น โดยการผสมน้ำ 40 ลิตร แล้วราดลงดินบริเวณรอบทรงพุ่มที่ทำการถากหญ้าออกเป็นวงกว้างประมาณ 50 ซม. ปัจจัยที่ 2 คือจำนวนสัปดาห์หลังการได้รับสาร $KClO_3$ จำนวน 6 ระดับ ได้แก่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 สัปดาห์ โดยใช้ต้นลำไยพันธุ์ดอ อายุ 8 ปี เส้นผ่าศูนย์กลางทรงต้นประมาณ 8 เมตร เริ่มทำการทดลองเมื่อวันที่ 30 ตุลาคม 2542 ที่สวนเกษตรกร ต.เหมืองจี้ อ.เมือง จ.ลำพูน

### อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่าง (Chaitrakulsup, 1981)

เก็บยอดลำไยยาว 10 เซนติเมตร ทุก ๆ 7 วัน โดยเริ่มเก็บวันที่ 30 ตุลาคม 2542 ถึง 4 ธันวาคม 2542 จำนวน 6 ครั้ง แต่ละครั้งเก็บยอดจำนวน 10 ยอด จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นและผึ่งให้แห้ง แล้วนำเข้าตู้อบที่มีอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นานเป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำตัวอย่างไปบดด้วยเครื่อง Wiley intermediate mill (Artur.H. Thomas Co., Philadelphia, U.S.A) ผ่านตะแกรงขนาด 40 mesh นำตัวอย่างที่ได้เก็บใส่ในถุงกระดาษ เก็บไว้ที่แห้งและเย็นเพื่อนำไปสกัดต่อไป

2. การหาน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (AOAC, 1984)

นำตัวอย่างแห้งที่ทราบน้ำหนักแล้วใส่ลงใน moisture dish แล้วเปิดฝา moisture dish และอบที่อุณหภูมิ 135 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นปิดฝาแล้วนำออกจากตู้อบแล้วย้ายออกมาเก็บในโถ desiccator ทิ้งไว้อย่างน้อย 12 ชั่วโมง และนำออกมาชั่งน้ำหนักโดยคำนวณหาปริมาณความชื้นจากสูตร

$$\text{\%ความชื้นในตัวอย่าง} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างแห้ง(ก่อนอบ-หลังอบ)}\times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างแห้งก่อนอบ}}$$

3. การสกัดตัวอย่าง (Chaitrakulsup, 1981)

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างลำไยบดแห้ง 0.4 กรัม แล้วใส่ลงไปใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติม $H_2SO_4$ 0.2 N 40 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดโดยใช้ aluminum foil อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วปรับ pH ให้เป็นกลาง ด้วย NaOH 6 N โดยใช้กระดาษลิตมัส ซึ่งเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีน้ำเงิน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 50 มิลลิลิตร จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42 นำส่วนที่กรองได้ประมาณ 30 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดพลาสติกขนาด 60 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำไปวิเคราะห์ต่อไป

4. การวิเคราะห์ปริมาณ reducing sugar (RS) (AOAC, 1984)

โดยการใช้วิธี Shaffer-Somogyi Copper Iodometric การเตรียมสารละลายที่นำไปวิเคราะห์ปริมาณ RS ทำดังนี้

4.1 สารละลาย Shaffer-Somogyi carbonate 50 reagent, 5 กรัม KI

ละลาย sodium carbonate และ potassium sodium tartrate อย่างละ 25 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ใน บีกเกอร์ขนาด 2,000 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย $CuSO_4 .5H_2O$ (ความเข้มข้น 100 กรัมในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร) นำมา 75 มิลลิลิตร โดยการผ่านกรวยโดยให้ปลายกรวยอยู่ใต้ผิวของสารละลาย เติม $NaHCO_3$ 20 กรัม ทำให้ละลาย และเติม KI 5 กรัมแล้วเทสารละลายทั้งหมดลงใน volumetric flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตรจากนั้นเติม $KIO_3$ 0.1 N (ความเข้มข้น 3.567 กรัม ในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร) 250 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร กรองทิ้งไว้หนึ่งคืนก่อนนำไปใช้

4.2 สารละลาย Iodide-oxalate

ละลาย KI และ $K_2C_2O_4$ อย่างละ 2.5 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร (ทั้งนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกสัปดาห์)

4.3 สารละลายมาตรฐาน sodium thiosulfate

เตรียมสารละลายมาตรฐาน sodium thiosulfate 0.005 N (ต้องเตรียมทุกวัน) จาก stock solution sodium thiosulfate 0.1 N

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน sodium thiosulfate 0.1 N โดยละลาย $Na_2S_2O_3 .5H_2O$ 25 กรัมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นค่อย ๆ ต้มให้เดือดนานเป็นเวลา 5 นาที และเทใส่ขวดสีชาในขณะที่ยังร้อนล้างขวดด้วยน้ำร้อนที่ต้มเดือดแล้ว เมื่อได้สารละลายเรียบร้อยแล้วให้เก็บไว้ในที่มืดและเย็น ไม่ควรนำสารละลายที่เทออกมาแล้วเทกลับลงคืนเข้าไปในขวด เพราะฉะนั้นหากต้องการใช้สารละลายที่มีความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 0.1 N ต้องทำการเตรียมใหม่ทุกวัน

โดยการเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มมาแล้ว เนื่องจากสารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำสลายตัวได้ จึงควรเตรียมเฉพาะที่ใช้ในแต่ละครั้งที่ทดลอง

5. การ standardization สารละลาย sodium thiosulfate

อบสาร $K_2Cr_2O_7$ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นานเป็นเวลา 2 ชั่วโมงแล้วปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาชั่ง 0.20-0.23 กรัม โดยใช้เครื่องชั่งละเอียดและนำมาใส่ในขวดสีชาหรือขวดที่หุ้มด้วย aluminum foil เติมสารละลาย KI (ชั่งสาร 2 กรัม ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร) 80 มิลลิลิตร จากนั้นเติม HCl 1 N 20 มิลลิลิตร เขย่าแล้วเก็บในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อนำไปไตเตรตกับสารละลาย $Na_2S_2O_3$ ที่เตรียมไว้ด้วยเครื่องไตเตรตอัตโนมัติ (automatic titration) (Schott Gerate T 90 TR 15, Schott Gerate, Germany) คำนวณ Normality ของสารละลาย sodium thiosulfate จากสูตร

$$\text{Normality} = gK_2Cr_2O_7 \times 1{,}000/mlNa_2S_2O_3 \times 49.032$$

6. การทำกราฟมาตรฐาน

ทำกราฟมาตรฐานโดยการเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 0.25-2.25 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 2.75 มิลลิกรัม/5 มิลลิลิตร เป็น stock solution และคำนวณความเข้มข้นออกมาเป็นส่วนต่อล้าน (สตล) โดยเตรียมสารละลาย 5 มิลลิลิตร มีกลูโคส 2.75 มิลลิกรัม

สารละลาย 1,000 มิลลิลิตร จะมีกลูโคส $\frac{2.75 \times 1{,}000}{5}$ = 550 มิลลิกรัม

ซึ่งสารละลายกลูโคสมาตรฐาน 550 มิลลิกรัม/ 1,000 คือความเข้มข้น 550 สตล

ดังนั้นในการเตรียมสารละลายกลูโคสมารฐานที่มีกลูโคส 0.25, 0.75, 1.25, 1.75, 2.25 ในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ก็สามารถคำนวณความเข้มข้นออกมาเป็นส่วนต่อล้าน (สตล) โดยวิธีการเดียวกันจะได้ดังนี้

สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 0.25 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร คือ ความเข้มข้น 50 สตล

สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 0.75 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร คือ ความเข้มข้น 150 สตล

สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 1.25 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร คือ ความเข้มข้น 250 สตล

สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 1.75 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร คือ ความเข้มข้น 350 สตล

สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 2.25 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร คือ ความเข้มข้น 450 สตล

การเตรียม stock ของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (กลูโคส 2.75 มิลลิกรัม ใน 5 มิลลิลิตร) โดยจะเตรียมจาก 1,000 มิลลิลิตร จากการชั่งน้ำตาลกลูโคสมา 550 มิลลิกรัม (0.550 กรัม) ด้วยเครื่องชั่งละเอียด นำมาละลายในน้ำกลั่นแล้วจากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 0.25-2.25 มิลลิกรัม ใน 5 มิลลิลิตร โดยที่ทุกความเข้มข้นจะเตรียมจาก 100 มิลลิลิตร จาก stock solution การคำนวณปริมาณของสารละลาย stock ของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ต้องการนั้นคำนวณได้จากสูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

โดย $N_1$ = ความเข้มข้นของ stock สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

$V_1$ = ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ต้องการเตรียม

$N_2$ = ปริมาณของ stock สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ต้องการ

$V_2$ = ปริมาณของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ต้องการเตรียม

ฉะนั้นเมื่อต้องการที่จะเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 2.25 ใน 5 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 450 สตล) โดยเตรียมจาก 100 มิลลิลิตรนั้นจะต้องดูดจากสารละลายใน stock มา

$$550 \text{ สตล} \times V_1 = 450 \text{ สตล} \times 100 \text{ มล}$$

$$V_1 = \frac{450 \text{ สตล} \times 100 \text{ มล}}{550}$$

$$V_1 = 81.8 \text{ มล}$$

จะต้องการดูด stock สารละลายกลูโคสมาตรฐานมา 81.8 มิลลิลิตรแล้วปรับด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

ส่วนในสารละลายที่ต้องการความเข้มอื่น ๆ นั้นก็คำนวณโดยใช้หลักการคำนวณเช่นเดียวกันโดยเมื่อเตรียมสารละลาย 100 มิลลิลิตรต้องดูดมาจาก stock สารละลายกลูโคสมาตรฐานดังนี้

สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 0.25 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร ดูดจาก stock 9.10 มิลลิลิตร
สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 0.75 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร ดูดจาก stock 27.27 มิลลิลิตร
สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 1.25 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร ดูดจาก stock 45.45 มิลลิลิตร
สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 1.75 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร ดูดจาก stock 63.64 มิลลิลิตร
สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 2.25 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร ดูดจาก stock 81.82 มิลลิลิตร

7. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล (AOAC, 1984)

ดูดสารละลายตัวอย่างที่สกัดจากยอดลำไยใน 5 มิลลิลิตรของแต่ละตัวอย่าง ใส่ในหลอดทดลองที่มีขนาด 25×200 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Shaffer-Somogyi carbonate 50 reagent 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เตรียม blank โดยใช้น้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร แล้วใส่ reagent 5 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลองด้วย aluminum foil และนำสารละลายตัวอย่างกับ blank ไปต้มให้เดือดนาน 15 นาที แล้วค่อย ๆ ยกออกมาอย่าให้กระเทือน นำไปวางในน้ำเย็นที่ 0 องศาเซลเซียสที่ไหลเวียนนาน 4 นาที เปิด aluminum foil เทสารละลาย iodide oxalate ลงข้าง ๆ หลอดอย่างช้า ๆ หลอดละ 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติม $H_2SO_4$ 2 N หลอดละ 3 มิลลิลิตร เขย่าให้ $CuO_2$ ละลายแล้วนำไปแช่น้ำเย็นที่ 0 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที (เขย่า 2 ครั้งในขณะที่ทำให้เย็น) จากนั้นนำไปไตเตรตกับสารละลายมาตรฐาน $Na_2S_2O_3$ 0.005 N นำปริมาตรที่ได้จากการไตเตรตลบกับ blank แล้วคำนวณหาปริมาณกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

8. การบันทึกผลการทดลอง

8.1 บันทึกปริมาณ sodium thiosulfate ที่ใช้ในการไตเตรตกับสารละลายตัวอย่างมีหน่วยเป็นมิลลิลิตรแล้วเทียบหาปริมาณน้ำตาลจากกราฟมาตรฐาน จากนั้นคำนวณหาปริมาณ TNC มีหน่วยเป็น mg glucose equivalent/gram dry weight (ภาคผนวกที่ 1)

8.2 วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Statistix 3.5 ของ NH Analysis software โดยวิเคราะห์ test of AOV assumption, AOV, C.V., LSD, linear regression และ correlation

**2. การเปลี่ยนแปลงปริมาณไนโตรเจนในช่วงก่อนการออกดอกของยอดลำไยพันธุ์ดอที่ได้รับสารโพแทสเซียมคลอเรต**

**การวางแผนการทดลอง**

การวางแผนทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 4×6 กรรมวิธี ทำ 3 ซ้ำ ปัจจัยที่ 1 คือสารโพแทสเซียมคลอเรตจำนวน 4 ระดับ ได้แก่ 0 , 200 , 500 และ 800 กรัม/ต้น โดยการผสมน้ำ 40 ลิตร แล้วราดลงดินบริเวณรอบทรงพุ่มที่ทำการถากหญ้าออกเป็นวงกว้างประมาณ 50 ซม. ปัจจัยที่ 2 คือจำนวนสัปดาห์หลังการได้รับสาร $KClO_3$ จำนวน 6 ระดับ ได้แก่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 สัปดาห์ โดยใช้ต้นลำไยพันธุ์ดอ อายุ 8 ปี เส้นผ่าศูนย์กลางทรงต้นประมาณ 8 เมตร เริ่มทำการทดลองเมื่อวันที่ 30 ตุลาคม 2542 ที่สวนเกษตรกร ต.เหมืองจี้ อ.เมือง จ.ลำพูน

**อุปกรณ์และวิธีการทดลอง** (ศรีสม, 2544)

1. การเตรียมตัวอย่าง

เก็บยอดลำไยยาว 10 เซนติเมตร ทุก ๆ 7 วัน โดยเริ่มเก็บวันที่ 30 ตุลาคม 2542 ถึง 4 ธันวาคม 2542 จำนวน 6 ครั้ง แต่ละครั้งเก็บยอดจำนวน 5 ยอด นำยอดลำไยมาล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วผึ่งให้แห้ง นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างมาบดด้วยเครื่อง Wiley intermediate mill (Artur.H. Thomas Co., Philadelphia, U.S.A) กรองผ่านตะแกรงขนาด 40 mesh ใส่ลงในถุงกระดาษเก็บไว้ในที่แห้งและเย็นเพื่อนำไปสกัดต่อไป

2. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ total nitrogen

2.1 สารละลาย potassium sulfate-catalyst mixture

ผสม $C_7H_6O_3$ 1.0 กรัม, $K_2SO_4$ 10 กรัม, $CuSO_4.H_2O$ 1 กรัม และ Selenium (Se) 0.1 กรัมบดให้เข้ากัน

2.2 Indicator Solution

ละลาย methyl red 0.066 กรัม และ bromeresol green 0.099 กรัม ใน ethanol 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดที่มีจุกปิดสนิท

2.3 Boric Acid - Indicator Solution

ละลาย $H_3BO_3$ 20 กรัม ใส่ใน beaker ขนาด 2 ลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 200 มิลลิลิตร นำไปอุ่นเพื่อให้ boric acid ละลายหมด เติมน้ำกลั่นอีก 700 มิลลิลิตร ตั้งสารละลายไว้ให้เย็นแล้วเติมสารละลาย indicator ลงไป 20 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย NaOH 0.1 N ลงไปอย่าง

ระมัดระวังจนกระทั่งสารละลายเป็นสีม่วงแดง ปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 1 ลิตร เขย่าผสมสารละลายให้เข้ากัน

3. การวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจน โดยใช้วิธี Micro-Kjeldahl method

ชั่งตัวอย่างพืชที่บดละเอียด 0.2 กรัม ใส่ลงใน Kjeldahl digestion flask (พยายามอย่าให้ตัวอย่างพืชติดอยู่บริเวณข้าง flask) เติม potassium sulfate-catalyst mixture 2 กรัม และเติม conc. $H_2SO_4$ 5 มิลลิลิตร เขย่า flask เบา ๆ ให้ตัวอย่างพืชและ potassium sulfate-catalyst mixture ผสมเข้ากันดีแล้วนำไปตั้งบนเตาย่อย (Kjeldahl digestion apparatus) โดยใช้อุณหภูมิต่ำ ๆ หลังจากฟอง (frothing) ใน flask หยุด แล้วจึงทำการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น ขณะทำการย่อยจะต้องหมุน flask เสมอ เพื่อให้มีการคลุกเคล้าดีขึ้น ย่อยตัวอย่างจนกระทั่งได้สารละลายสีเขียวใส โดยใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง ตั้ง flask ไว้ให้เย็น แล้วถ่ายลงไปใน Kjeldahl distillation flask ล้าง Kjeldahl digestion flask ด้วยน้ำกลั่นไม่ให้มีตัวอย่างเหลืออยู่ใน Kjeldahl digestion flask

นำ Erlenmeyer flask ซึ่งมี boric acid-indicator solution บรรจุอยู่ 15 มิลลิลิตรมารองรับใช้ condenser ของเครื่องกลั่น (Kjeldahl distillation apparatus) จุ่มลงใน boric acid เปิดก๊อกที่เชื่อมต่อระหว่าง Kjeldahl distillation flask กับ Kjeldahl distillation chamber เบา ๆ เพื่อให้ตัวอย่างไหลสู่ Kjeldahl distillation chamber ช้า ๆ จนหมด แล้วใช้น้ำกลั่นล้างจนแน่ใจว่าตัวอย่างไหลไปสู่ Kjeldahl distillation chamber หมดปิดก๊อกเติม NaOH 10 N ปริมาณ 20 มิลลิลิตรใน Kjeldahl distillation flask และเปิดก๊อกเบา ๆ เพื่อให้เข้าไปผสมกับตัวอย่างใน Kjeldahl distillation chamber ใช้น้ำกลั่นล้าง NaOH ให้หมด แล้วปิดก๊อก (เขย่าให้ NaOH ทำปฏิกิริยากับตัวอย่าง) กลั่นเพื่อเก็บแก๊ส $NH_3$ จนกว่าปริมาตรของสารใน Erlenmeyer flask มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปไตเตรตกับสารละลายมาตรฐาน $H_2SO_4$ 0.05 N จนถึงจุด end point ซึ่งสีจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงปนแดง ทำ blank ควบคู่ไปด้วยกับตัวอย่างโดยปฏิบัติเช่นเดียวกันทุกอย่าง

4. การบันทึกผลการทดลอง

4.1 บันทึกปริมาณ 0.05 N $H_2SO_4$ ที่ใช้ในการไตเตรตกับสารละลายตัวอย่างแล้วนำมาคำนวณหาปริมาณ total nitrogen ในตัวอย่างพืชโดยใช้สูตร

$$\text{Total Nitrogen} = \frac{(\text{ml.}H_2SO_4\text{.sample-ml. }H_2SO_4\text{.blank}) \times N \times 0.014}{\text{Dry weight of sample (g.)}}$$

4.2 วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Statistix 3.5 ของ NH Analysis software โดยวิเคราะห์ test of AOV assumption, AOV, C.V. และ LSD

**3. การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินในช่วงก่อนการออกดอกของยอดลำไยพันธุ์ดอที่ได้รับสารโพแทสเซียมคลอเรต**

**การวางแผนการทดลอง**

การวางแผนทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 4×7 กรรมวิธี ทำ 3 ซ้ำ ปัจจัยที่ 1 คือสารโพแทสเซียมคลอเรตจำนวน 4 ระดับ ได้แก่ 0 , 200 , 500 และ 800 กรัม/ต้น โดยการผสมน้ำ 40 ลิตร แล้วราดลงดินบริเวณรอบทรงพุ่มที่ทำการถากหญ้าออกเป็นวงกว้างประมาณ 50 ซม. ปัจจัยที่ 2 คือจำนวนสัปดาห์หลังการได้รับสาร $KClO_3$ จำนวน 7 ระดับ ได้แก่ 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 สัปดาห์ โดยใช้ต้นลำไยพันธุ์ดอ อายุ 8 ปี เส้นผ่าศูนย์กลางทรงต้นประมาณ 8 เมตร เริ่มทำการทดลองเมื่อวันที่ 1 ธันวาคม 2543 ที่สถานีวิจัยศูนย์ฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

**อุปกรณ์และวิธีการทดลอง (นพพร, 2539)**

1. การเตรียมตัวอย่าง (sample preparation)

เก็บยอดลำไยยาว 10 เซนติเมตร ทุก ๆ 7 วัน โดยเริ่มเก็บวันที่ 1 ธันวาคม 2543 ถึง 5 มกราคม 2544 จำนวน 7 ครั้ง แต่ละครั้งเก็บยอดจำนวน 30 ยอด ต่อหนึ่งหน่วยการทดลอง ตัดใบทิ้งแล้วใส่ถุงพลาสติกแช่น้ำแข็งในกระติกน้ำแข็งเพื่อการขนส่งไปยังห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อสกัดต่อไป

2. การสกัด (extraction)

นำตัวอย่างมาปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องบด (Nation รุ่น MX-795N, Matsushita Electric Industrial Co.,Ltd, Malaysia) ชั่งน้ำหนักตัวอย่างสดให้ได้ 20.00 กรัมต่อหนึ่งตัวอย่าง ด้วยเครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) แล้วนำมาใส่ใน erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม methanol (Lab grade) 95% ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายให้ผสมกันแล้วนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วนำกากไปสกัดซ้ำอีก 2 ครั้งนำสารละลายที่กรองได้มารวมกันแล้วนำไประเหยด้วยเครื่องระเหยความดันต่ำ (vacuum rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนแห้งติดก้นขวด แล้วจึงละลายส่วนที่แห้งด้วย sodium phosphate buffer 0.5 M pH 8.0 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร

3. การแยกส่วน ( partition)

นำสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้มาแยกส่วนด้วยกรวยแยก (separatory funnel) โดยใช้ ethyl acetate (Lab grade) 100% ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้จนสารละลายแยกชั้นแยกเอาส่วนบน (ethyl acetate) เก็บไว้นำชั้นล่างซึ่งเป็นสารละลายบัฟเฟอร์มาปรับ pH ให้เป็น 2.0-2.5 ด้วย HCl 6 N แล้วนำไปแยกส่วนด้วย ethyl acetate ปริมาตร 20 มิลลิลิตร อีก 4 ครั้ง จากนั้นนำสารละลาย ethyl acetate ที่ได้ทั้ง 5 ครั้ง มารวมกันแล้วนำไปประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยความดันต่ำที่มีอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จนแห้งติดก้นขวด แล้วละลายส่วนที่แห้งด้วย methanol 95% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric pipet แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไปทำ paper chromatography

4. การเตรียมสารละลาย $GA_3$ (Kyowa)

เตรียมสารละลาย $GA_3$ (Kyowa) ที่ระดับความเข้มข้น $1\times10^{-1}$, $1\times10^{-3}$, $1\times10^{-5}$, $1\times10^{-7}$, $1\times10^{-9}$ และ $1\times10^{-11}$ สตล โดยเตรียมจากการทำ stock สารละลาย $GA_3$ (Kyowa) เข้มข้น 2,000 สตล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ดังนั้น $GA_3$ (Kyowa) 2,000 สตล ในน้ำ 50 มิลลิลิตรมีเนื้อสาร 100 มิลลิกรัม

$GA_3$ (Kyowa) 1.6 กรัม มีเนื้อสารอยู่ 50 มิลลิกรัม

ถ้าต้องการเนื้อสาร 100 มิลลิกรัม จะต้องชั่งสาร $\frac{100\times1.6}{50} = 3.2$ กรัม

ดังนั้นชั่ง $GA_3$ (Kyowa) มา 3.2 กรัมด้วยเครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ละลายใน น้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นใน volumetric flask ให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย $GA_3$ (Kyowa) เข้มข้น 2,000 สตล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำ stock solution ที่ได้ไปเจือจางให้เป็น 1 สตล ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ดังนี้

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

$$V_1 = \frac{1,000\times1}{2,000} = 0.5 \text{ มิลลิลิตร}$$

$N_1$ = ความเข้มข้นของ stock $GA_3$ (Kyowa) หน่วยเป็น สตล

$N_2$ = ความเข้มข้นของ (Kyowa) ที่ต้องการ หน่วยเป็น สตล

$V_1$ = ปริมาตรของ stock $GA_3$ (Kyowa) หน่วยเป็น มล

$V_2$ = ปริมาตรของ $GA_3$ (Kyowa) ความเข้มข้นที่ต้องการ หน่วยเป็น มล

ดังนั้นจึงใช้ graduate pipet ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ดูดสารละลายมา 0.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ใน volumetric flask จะได้สารละลาย $GA_3$ (Kyowa) เข้มข้น 1 สตล ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ส่วนการเตรียม $GA_3$ (Kyowa) เข้มข้น $1\times10^{-1}$, $1\times10^{-3}$, $1\times10^{-5}$, $1\times10^{-7}$, $1\times10^{-9}$ และ $1\times10^{-11}$ สตล สามารถเตรียมได้จาก $GA_3$ (Kyowa) เข้มข้น 1 สตล โดยคำนวณจากสูตรและเตรียมวิธีเดียวกัน

5. การทำกราฟมาตรฐาน

5.1 นำเมล็ดพันธุ์ข้าวแพร่ 1 ประมาณ 600 เมล็ด มาฆ่าเชื้อโดยแช่ในสารละลาย sodium hypochlorite 5.25%:น้ำ (1:9 โดยปริมาตร) เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

5.2 เพาะเมล็ดข้าวบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ที่วางอยู่ในกล่องพลาสติกขนาด 16×2×48 เซนติเมตร (กว้าง×ยาว×สูง) จำนวน 4 กล่องพ่นน้ำกลั่นให้เปียกชุ่ม ปิดฝากล่องแล้วนำไปไว้ในที่มืดในตู้ควบคุมสภาพแวดล้อม (growth chamber) ที่มีอุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน

5.3 ตัดกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ใส่ลงในกล่องพลาสติกขนาด 6×4×3.5 เซนติเมตร แล้วใช้ graduate pipet ดูดสารละลาย $GA_3$ (Kyowa) ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในกล่องพลาสติกความเข้มข้นละ 10 กล่อง

5.4 คัดเมล็ดข้าวที่มี coleoptile ยาวประมาณ 5 มิลลิลิตร จากที่เพาะไว้ ใส่ในกล่องพลาสติกที่เตรียมไว้กล่องละ 10 ต้น ปิดฝากล่องแล้วปิดด้วยเทปกาว แล้วนำไปไว้ในตู้ควบคุมสภาพแวดล้อมซึ่งมีแสงจากหลอด fluorescent ความเข้มแสงประมาณ 115.38 วัตต์/ตารางเมตร อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

6. การหาตำแหน่ง Rf ที่มี activity โดยวิธี Rice Secondary Leaf Sheath Bioassay (RSLSB)

6.1 การทำ paper chromatography เตรียมแผ่น chromatogram โดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาด 9×28 เซนติเมตร ขีดเส้นกำหนดจุดเริ่มต้นห่างจากขอบล่าง 2 เซนติเมตรและจุดสุดท้ายที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปถึง (16.5 เซนติเมตร วัดจากจุดเริ่มต้น) นำสารละลายตัวอย่าง (สุ่มจากตัวอย่างทั้งหมด) ที่แยกส่วนแล้วนำมา strip ลงบนแผ่น chromatogram โดยใช้ตัวอย่างแผ่นละ 50 µl (ซึ่งเทียบเท่าตัวอย่างสด 1 กรัม) ปล่อยไว้จนสารละลายตัวอย่างแห้งบนแผ่น chromatogram

6.2 นำ chromatogram ไปแช่ใน solvent chamber ที่มีตัวทำละลาย isopropanol (A.R. grade) 99.7% : $NH_4$ OH (A.R. grade) 25% : น้ำกลั่น (10:1:1 โดยปริมาตร) โดยให้แถบสารอยู่เหนือตัวทำละลาย ทิ้งไว้จนตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปถึงระยะ 16.5 เซนติเมตร วัดจากรอย strip สารใช้เวลาประมาณ 6-7 ชั่วโมง ให้นำออกจาก solvent chamber แล้วนำไปผึ่งให้แห้ง

6.3 เมื่อ chromatogram แห้งแล้ว แบ่งแผ่น chromatogram เป็น Rf 0.1-1.0 โดยใช้ส่วนที่อยู่ใต้แถบสารเป็น control (Rf 0.0) ส่วน Rf 0.1-1.0 คือส่วนที่อยู่เหนือแถบสารจนถึง solvent front ให้แบ่งเป็น 10 ส่วนเท่า ๆ กัน แล้วตัดกระดาษ แต่ละ Rf เป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ในกล่องพลาสติกขนาด 6×4×3.5 เซนติเมตร ที่มีสารละลาย potassium phosphate buffer 0.01 M pH 5.0 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

6.4 นำเมล็ดข้าวพันธุ์แพร่ 1 แช่ในสารละลาย sodium hypochlorite 5.25% : น้ำ (1:9โดยปริมาตร) เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วนำไปเพาะในที่มืดที่มีอุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

6.5 คัดต้นกล้าข้าวที่มี coleoptile ยาวประมาณ 5 มิลลิลิตร วางลงในกล่องพลาสติกขนาด 6×4×3.5 เซนติเมตร ที่มี chromatogram ของแต่ละ Rf ที่ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ และมีสารละลาย potassium phosphate buffer 0.01 M pH 5.0 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร กล่องละ 10 ต้น ทำการทดลอง 10 ซ้ำ ปิดฝากล่องแล้วปิดด้วยเทปกาวนำไปไว้ในตู้ควบคุมสภาพแวดล้อมที่มีแสงจากหลอด fluorescent เข้มแสง 115.38 วัตต์/ตารางเมตร อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

7. การหาปริมาณเปลี่ยนแปลงสารคล้ายจิบเบอเรลลินโดยวิธี Rice Secondary Leaf Sheath Bioassay (RSLSB)

7.1 การทำ paper chromatography เตรียมแผ่น chromatogram โดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาด 9×28 เซนติเมตร ขีดเส้นกำหนดจุดเริ่มต้นห่างจากขอบล่าง 2 เซนติเมตรและจุดสุดท้ายที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปถึง (16.5 เซนติเมตร วัดจากจุดเริ่มต้น) นำสารละลายตัวอย่างที่แยกส่วนแล้วนำมา strip ลงบนแผ่น chromatogram โดยใช้ตัวอย่างแผ่นละ 50 µl (ซึ่งเทียบเท่าตัวอย่างสด 1 กรัม) ปล่อยไว้จนสารละลายตัวอย่างแห้งบนแผ่น chromatogram

7.2 นำ chromatogram ไปแช่ใน solvent chamber ที่มีตัวทำละลาย isopropanol (A.R. grade) 99.7% : $NH_4$ OH (A.R. grade) 25% : น้ำกลั่น (10:1:1 โดยปริมาตร) โดยให้แถบสารอยู่เหนือตัวทำละลาย ทิ้งไว้จนตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปถึงระยะ 16.5 เซนติเมตร วัดจากรอย strip สารใช้เวลาประมาณ 6-7 ชั่วโมง ให้นำออกจาก solvent chamber แล้วนำไปผึ่งให้แห้ง

7.3 เมื่อ chromatogram แห้งแล้วแบ่งแผ่น chromatogram เป็น Rf 0.1-1.0 โดยใช้ส่วนที่อยู่ใต้แถบสารเป็น control (Rf 0.0) ส่วน Rf 0.1-1.0 คือส่วนที่อยู่เหนือแถบสารจนถึง solvent front ให้แบ่งเป็น 10 ส่วนเท่า ๆ กัน แล้วตัด chromatogram เฉพาะส่วนที่เป็น Rf 0.3-0.8เป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ในกล่องพลาสติกขนาด 6×4×3.5 เซนติเมตร ที่มีสารละลาย potassium phosphate buffer 0.01 M pH 5.0 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

7.4 นำเมล็ดข้าวพันธุ์แพร่ 1 แช่ในสารละลาย sodium hypochlorite 5.25% : น้ำ (1:9โดยปริมาตร) เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วนำไปเพาะในที่มืดที่มีอุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

7.5 คัดต้นกล้าข้าวที่มี coleoptile ยาวประมาณ 5 มิลลิลิตร วางลงในกล่องพลาสติกขนาด 6×4×3.5 เซนติเมตร ที่มีแผ่น chromatogram ที่ Rf 0.3-0.8 ซึ่งเป็น Rf ที่พบ activity ของจิบเบอเรลลินในยอดลำไยจากกล่องละ 10 ต้น ทำการทดลอง 12 ซ้ำ แล้วนำไปไว้ในตู้ควบคุมสภาพแวดล้อมที่มีแสงจากหลอด fluorescent ความเข้มแสง 115.38 วัตต์/ตารางเมตร อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

8. บันทึกผลการทดลอง

8.1 บันทึกความยาวของ rice secondary leaf sheath วัดเมื่ออายุได้ 7 วันหลังจากบ่ม

8.2 เทียบหาปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินจากกราฟมาตรฐานมีหน่วยเป็น μg $GA_3$ (Kyowa) equivalent/ g f. wt. (ภาคผนวกที่ 2)

8.3 วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Statistix 3.5 ของ NH analytical software โดยวิเคราะห์ test of AOV assumption, AOV, C.V. , LSD, linear regression และ correlation

## 4. การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินในช่วงก่อนการออกดอกของยอดลำไยพันธุ์ดอที่ได้รับสารโพแทสเซียมคลอเรต

### การวางแผนการทดลอง

การวางแผนทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 4×7 กรรมวิธี ทำ 3 ซ้ำ ปัจจัยที่ 1 คือสารโพแทสเซียมคลอเรตจำนวน 4 ระดับ ได้แก่ 0 , 200 , 500 และ 800 กรัม/ต้น โดยการผสมน้ำ 40 ลิตร แล้วราดลงดินบริเวณรอบทรงพุ่มที่ทำการถากหญ้าออกเป็นวงกว้างประมาณ 50 ซม. ปัจจัยที่ 2 คือจำนวนสัปดาห์หลังการได้รับสาร $KClO_3$ จำนวน 7 ระดับ ได้แก่ 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 สัปดาห์ โดยใช้ต้นลำไยพันธุ์ดอ อายุ 8 ปี เส้นผ่าศูนย์กลางทรงต้นประมาณ 8 เมตร เริ่มทำการทดลองเมื่อวันที่ 1 ธันวาคม 2543 ที่สถานีวิจัยศูนย์ฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

### อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่างพืช (sample preparation) (ดรุณี , 2539)

เก็บยอดลำไยยาว 10 เซนติเมตร ทุก ๆ 7 วัน โดยเริ่มเก็บวันที่ 1 ธันวาคม 2543 ถึง 5 มกราคม 2544 เก็บจำนวน 7 ครั้ง แต่ละครั้งเก็บยอดจำนวน 30 ยอด ต่อหนึ่งหน่วยการทดลอง ตัดใบทิ้งแล้วใส่ถุงพลาสติกแช่น้ำแข็งในกระติกน้ำแข็งเพื่อการขนส่งไปยังห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อสกัดต่อไป

2. การสกัด (extraction) (ดรุณี , 2539)

นำลำไย 30 ยอดที่เก็บไว้ในแต่ละถุงมาบดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องบด (Nation รุ่น MX-795N, Matsushita Electric Industrial Co.,Ltd, Malaysia) ชั่งน้ำหนักตัวอย่างสดให้ได้ประมาณ 20.00 กรัมต่อหนึ่งตัวอย่าง ด้วยเครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) จากนั้นนำตัวอย่างสดที่บดแล้วใส่ใน erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วเติม ethanol (Lab grade) 80% ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ปิด flask ด้วยจุกยาง เขย่าสารละลายให้ผสมกัน แล้วนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 17 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วนำสารละลายที่กรองได้ไปลดปริมาตรด้วยเครื่องระเหยความดันต่ำ (vacuum rotary evaporator) ในสภาพสุญญากาศที่ 600 mm Hg อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนเหลือปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้ได้ 2.5 ด้วยกรด HCl (Lab grade) 6 N

3. การแยกส่วน (partitioning) (ดรุณี , 2539)

นำสารละลายที่ปรับ pH แล้วมาแยกส่วนโดยใช้ ethyl acetate (Lab grade) 100% (โดยใช้อัตราส่วนตัวอย่างสด 1 กรัม ต่อ ethyl acetate 1.5 มิลลิลิตร) โดยใส่กรวยแยก (separatory funnel) เขย่าสารละลายให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้จนสารละลายแยกชั้นให้แยกเอาส่วนล่างซึ่งเป็นสารที่ละลายในน้ำ (water phase) ปริมาตรประมาณ 30 มิลลิลิตร (เทียบเท่าน้ำหนักตัวอย่างสด 20 กรัม) นำไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

4. การทำกราฟมาตรฐาน (ดรุณี, 2539)

4.1 คัดเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 5 เอาเมล็ดที่ขึ้นราทิ้งไป และนำไปแช่น้ำ คัดเอาเมล็ดที่จมน้ำมาใช้ คัดเมล็ดที่มีขนาดใกล้เคียงกันประมาณ 90 เมล็ด นำมาฆ่าเชื้อโดยใส่ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมี ethanol (Lab grade) 75% แช่เมล็ดเขย่าตลอดเวลา เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำเมล็ดไปแช่ในสารละลาย sodium hypocoloride 5.25 % : น้ำ (1 : 9โดยปริมาตร) เขย่าตลอดเวลาเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 5 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที (ทำในสภาพปลอดเชื้อ)

4.2 เตรียมอาหารวุ้นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ซึ่งมีส่วนประกอบของน้ำตาล (sucrose) 15 กรัม : วุ้นผง (วุ้นใช้ 0.8%) 4 กรัมต่อน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เทใส่หลอดทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.4 เซนติเมตร ยาว 15 เซนติเมตร หลอดละ 10 มิลลิลิตร ปิดปากหลอดทดลองด้วยพลาสติก PP (polypopylene) รัดด้วยยางแล้วใช้กระดาษขนาด 7.5×7.5 เซนติเมตร ปิดรัดด้วยยางอีกชั้นหนึ่งนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยไล่อากาศก่อนเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นจึงนึ่งที่ความดันประมาณ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที แล้วปล่อยให้ความดันลดลงจนเท่ากับภายนอกจึงเปิดหม้อนึ่ง

4.3 นำเมล็ดถั่วเหลือง สจ. 5 มาเพาะในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้น (ในสภาพปลอดเชื้อ) แล้วนำไปไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

4.4 เตรียมสารละลายไคเนตินความเข้มข้น $5\times10^{-1}$, $5\times10^{-2}$, $5\times10^{-3}$, $5\times10^{-4}$ และ $5\times10^{-5}$ สตล ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ผสมในอาหารวุ้นสูตร Miller (1961) (ตารางที่ 1) แล้วใส่ลงไปในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยไล่อากาศก่อนเป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงนึ่งที่ความดันประมาณ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นให้ความดันลดลงจนเท่ากับภายนอกจึงเปิดหม้อนึ่ง

**ตารางที่ 1** ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยง hypocotyl สูตร Miller (1961)

| สารเคมี | ความเข้มข้น (สตล) |
|---|---|
| $KH_2PO_4$ | 300 |
| $KNO_3$ | 1,000 |
| $NH_4NO_3$ | 1,000 |
| $Cu(NO_3)_2.3H_2O$ | 0.36 |
| $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ | 500 |
| $MgSO_4.H_2O$ | 71.5 |
| KCl | 65.0 |
| $MnSO_4.\ H_2O$ | 14.0 |
| $(NH_4)_6.\ Mo_7O_2.4H_2O$ | 0.1 |
| KI | 0.75 |
| $ZnSO_4.7H_2O$ | 3.80 |
| $H_3BO_3$ | 1.60 |
| Myoinositol | 100 |
| Nicotinic acid | 0.5 |
| Pyridoxine.HCl | 0.2 |
| Thiamine.HCl | 0.2 |
| $Na_2EDTA$ | 13.4 |
| $FeSO_4.7H_2\ O$ | 9.9 |
| Sucrose | 30,000 |
| Bacto agar | 10,000 |
| Naphthalene acetic acid | 2.0 |
| Kinetin | 0.5 |

**หมายเหตุ** : ปริมาณ kinetin เปลี่ยนแปลงตามวัตถุประสงค์ของการทดลอง

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

4.5 นำ hypocotyl ออกมาจากหลอดทดลองในตู้ laminar air flow โดยเปิดฝาพลาสติกออกแล้วลนปากหลอดที่ตะเกียงแอลกอฮอล์แล้วใช้ปากคีบที่นึ่งฆ่าเชื้อ และได้ทำการเผาฆ่าเชื้อแล้วอีกรอบคีบ hypocotyl ออกมา ตัดใน petridish ที่มีแผ่นพลาสติกรองไว้ โดยใช้ใบมีดเบอร์ 11 ที่เผาฆ่าเชื้อแล้วตัดเอาส่วนที่เป็นใบเลี้ยงและส่วนรากทิ้งไปแล้วย้าย hypocotyl ที่ตัดแล้วมาวางลงใน petridish อีกอันที่มีแผ่นพลาสติกรองไว้ แล้วใช้ใบมีดเบอร์ 11 อีกอันตัด hypocotyl ยาวชิ้นละ 1 มิลลิเมตร ใช้ปากคีบที่เผาฆ่าเชื้อแล้วคีบ hypocotyl ที่ตัดแล้วใส่ลงในขวดอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อขวดละ 8 ชิ้น วางห่างกัน 0.3-0.4 มิลลิเมตร โดยเลือก hypocotyl ทั้งจากส่วนที่ใกล้กับบริเวณใบเลี้ยงหรือส่วนที่ใกล้กับบริเวณรากให้เฉลี่ยกันไปในแต่ละขวดเพื่อจะเป็นการลดความผันแปร (correlation of variance) ของการทดลอง ลนปากขวดที่ตะเกียงแอลกอฮอล์แล้วปิดปากขวดด้วยแผ่นพลาสติก PP (polypropylene) รัดด้วยยาง (ทำในสภาพปลอดเชื้อ)

4.6 นำไปบ่มในตู้ควบคุมการเจริญเติบโตอุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสงประมาณ 1,000 lux เป็นเวลา 13 วัน

5 การทำให้บริสุทธิ์ (purification) (โรจน์รวี , 2538)

5.1 การกำจัดสิ่งเจือปนและสารยับยั้งการเจริญเติบโตโดยใช้ column chromatography นำสารละลายส่วน water phase ผ่านลงใน column ซึ่งบรรจุ Dowex 50 W Cation Resin 8×100 (ขนาด 50-100 mesh) column ที่ใช้คือ burette ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ยาว 25 เซนติเมตร ความสูงของ Dowex 50 W Resin ซึ่งบรรจุใน burette ประมาณ 20 เซนติเมตร (การบรรจุ Dowex 50 W Resin ใส่ใน burette นั้นต้องแช่ Dowex 50 W Resin ในน้ำกลั่นประมาณ 20 นาที เพื่อให้ Dowex 50 W Resin ขยายตัวเต็มที่ก่อน จึงบรรจุลงใน burette) จากนั้นล้าง column ด้วยน้ำกลั่นประมาณ 100 มิลลิลิตร แล้วจึงผ่านสารละลายส่วน water phase ลงใน column ครั้งละ 10 มิลลิลิตร ปล่อยให้สารละลายไหลผ่าน column ในอัตราเร็วประมาณ 2 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อสารละลายลดระดับลงจนใกล้จะถึงผิวหน้าของ resin แล้วเริ่มล้างด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ในอัตราเร็วเดียวกัน เมื่อน้ำกลั่นลดระดับใกล้ถึงผิวหน้าของ resin เติม ethanol (Lab grade) 70% 20 มิลลิลิตร แล้วปรับให้ไหลผ่าน column ในอัตราเร็วเดียวกัน เมื่อ ethanol ลดระดับใกล้ถึงผิวหน้าของ resin เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ล้างในอัตราเดียวกัน สารละลายทั้งหมดที่ไหลออกมาให้ทิ้งไปในขั้นตอนนี้ไซโตไคนินที่อยู่ใน water phase เมื่อผ่าน column แล้วไซโตไคนินจะถูกดูดยึดอยู่ที่ Dowex resin ส่วน hormone หรือ inhibitor ตัวอื่น ๆ จะไม่ถูกดูดยึดที่ Dowex resin ดังนั้นจะเหลือเฉพาะสารคล้ายไซโตไคนินและสารที่เป็น cation อยู่ใน column

5.2 เก็บสารละลายที่ผ่านออกมาเมื่อชะด้วย $NH_4OH$ (Lab grade) 5 N เมื่อ $NH_4OH$ ลดระดับลง ใกล้จะถึงผิวหน้าของ resin เติมน้ำกลั่นอีก 20 มิลลิลิตรแล้ว เก็บสารละลายที่ผ่านออกมา เมื่อล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นครั้งสุดท้าย ซึ่งจะมีปริมาตรรวมกันประมาณ 40 มิลลิลิตร จากนั้นล้าง column เพื่อใช้ใหม่ (เพื่อผ่าน water phase ครั้งต่อไป) โดยเติมด้วยกรด HCl (Lab grade) 5 N 20 มิลลิลิตร ปล่อยให้กรดผ่าน column ในอัตรา 2 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อกรดลดระดับลงจนใกล้ผิวหน้าของ resin ให้เติมน้ำกลั่นทีละ 20 มิลลิลิตร จนครบ 100 มิลลิลิตร โดยปล่อยให้ไหลในอัตรา 2 มิลลิลิตรต่อนาที

5.3 นำสารละลาย water phase มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการเดียวกับวิธีการดังกล่าว นำสารละลายที่เก็บได้มารวมกัน จากนั้นนำไปลดปริมาตรด้วยเครื่องระเหยความดันต่ำ (Vacuum rotary evaporator) ในสภาพสูญญากาศที่ 600 mm Hg อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสให้เหลือสารละลายเพียงเล็กน้อย (น้อยกว่า 1 มิลลิลิตร) จากนั้นดูดสารละลายที่เหลือด้วย graduate pipet ขนาด 1 มิลลิลิตร แล้วล้างสารละลายที่ติดในขวดระเหยด้วย ethanol (Lab grade) 80% ทีละน้อย แล้วดูดด้วย graduate pipet พยายามล้างสารละลายออกจากขวดให้ได้มากที่สุดจนได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อนำไปทำ paper chromatography ต่อไป

6 การหาตำแหน่ง Rf ที่มี activity โดยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay (SHB)

6.1 การทำ paper chromatography เตรียมแผ่น chromatogram โดยใช้กระดาษ Whatman เบอร์ 1 ขนาด 9×28 เซนติเมตร ดูดสารละลายตัวอย่าง (สุ่มจากตัวอย่างทั้งหมด) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ จำนวน 300 μl (ซึ่งเทียบเท่าตัวอย่างสด 6 กรัม) ทำการทดลอง 5 ซ้ำ แล้วใช้หลอดแก้วแคปปิลารี่ดูดสารละลายมา strip เป็นแนวยาวบนกระดาษ chromatogram ห่างจากด้านล่างประมาณ 2 เซนติเมตร แล้วทำให้แห้งโดยใช้เครื่องเป่าผม หลังจากนั้น strip สารละลายซ้ำจนกว่าจะหมดสารตัวอย่าง (ทุกครั้งที่ strip ต้องเป่าให้แห้ง) แล้วนำไปจุ่มใน solvent chamber ที่มีตัวทำละลายซึ่งประกอบด้วย isopropanol (A.R. grade) 99.7% : $NH_4OH$ (A.R. grade) 25 % : $H_2O$ (อัตรา 10 : 1 : 1 โดยปริมาตร) ให้แถบสารอยู่เหนือตัวทำละลาย ทิ้งไว้จนสารละลายเคลื่อนที่ไปจนถึงระยะ solvent front ประมาณ 18 เซนติเมตร (วัดจากรอย strip) ใช้เวลาประมาณ 8 ชั่วโมง จากนั้นนำไปผึ่งให้แห้งแล้วแบ่งแผ่น chromatogram เป็น Rf 0.1-1.0 (ซึ่งเป็นส่วนที่อยู่เหนือแถบสารจนถึงระยะ solvent front) โดยแบ่งออกเป็น 10 ส่วนเท่า ๆ กัน ส่วน Rf 0.0 จะอยู่ใต้แถบสาร

6.2 เตรียมอาหารวุ้นตามสูตรของ Miller (1961) แต่ไม่ใส่ kinetin (เตรียมอาหารปริมาตร 2,000 มิลลิลิตร) เมื่อนำ chromatogram ที่ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ของแต่ละ Rf ใส่ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำอาหารวุ้นที่เทลงไปขวดละ 10 มิลลิลิตร ปิดปากขวดนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยไล่อากาศก่อนเป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงนำไปนึ่งที่ความดันประมาณ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา

20 นาที จากนั้นให้ความดันภายในหม้อนึ่งลดลงจนเท่ากับภายนอกจึงเปิดหม้อนึ่ง

6.3 นำ hypocotyl ออกมาจากหลอดทดลองในตู้ laminar air flow โดยเปิดฝาพลาสติกออกแล้วลนปากหลอดที่ตะเกียงแอลกอฮอล์แล้วใช้ปากคีบที่นึ่งฆ่าเชื้อ และได้ทำการเผาฆ่าเชื้อแล้วอีกรอบคีบ hypocotyl ออกมา ตัดใน petridish ที่มีแผ่นพลาสติกรองไว้ โดยใช้ใบมีดเบอร์ 11 ที่เผาฆ่าเชื้อแล้วตัดเอาส่วนที่เป็นใบเลี้ยงและส่วนรากทิ้งไปแล้วย้าย hypocotyl ที่ตัดแล้วมาวางลงใน petridish อีกอันที่มีแผ่นพลาสติกรองไว้ แล้วใช้ใบมีดเบอร์ 11 อีกอันตัด hypocotyl ยาวชิ้นละ 1 มิลลิเมตร ใช้ปากคีบที่เผาฆ่าเชื้อแล้วคีบ hypocotyl ที่ตัดแล้วใส่ลงในขวดอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มี chromatogram ของแต่ละ Rf ขวดละ 8 ชิ้น วางห่างกัน 0.3-0.4 มิลลิเมตร โดยเลือก hypocotyl ทั้งจากส่วนที่ใกล้กับบริเวณใบเลี้ยงหรือส่วนที่ใกล้กับบริเวณรากให้เฉลี่ยกันไปในแต่ละขวดเพื่อจะเป็นการลดความผันแปร (correlation of variance) ของการทดลอง ลนปากขวดที่ตะเกียงแอลกอฮอล์แล้วปิดปากขวดด้วยแผ่นพลาสติกPP (polypropylene) รัดยาง (ทำในสภาพปลอดเชื้อ)

6.4 นำไปบ่มในตู้ควบคุมการเจริญเติบโตอุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสงประมาณ 1,000 lux เป็นเวลา 13 วัน

7 การหาปริมาณการเปลี่ยนแปลงสารคล้ายไซโตไคนิน โดยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay (SHB)

7.1 การทำ paper chromatography เตรียมแผ่น chromatogram โดยใช้กระดาษ Whatman เบอร์ 1 ขนาด 9×28 เซนติเมตร ดูดสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ จำนวน 300 µl (ซึ่งเทียบเท่าตัวอย่างสด 6 กรัม) แล้วใช้หลอดแก้วแคปปิลารี่ดูดสารละลายมา strip เป็นแนวยาวบนกระดาษ chromatogram ห่างจากด้านล่างประมาณ 2 เซนติเมตร แล้วทำให้แห้งโดยใช้เครื่องเป่าผมหลังจากนั้น strip สารละลายซ้ำจนกว่าจะหมดสารตัวอย่าง (ทุกครั้งที่ strip ต้องเป่าให้แห้ง) แล้วนำไปจุ่มใน solvent chamber ที่มีตัวทำละลายซึ่งประกอบด้วย isopropanol (A.R. grade) 99.7% : $NH_4OH$ (A.R. grade) 25 % : $H_2O$ (อัตรา 10 : 1 : 1 โดยปริมาตร) ให้แถบสารอยู่เหนือตัวทำละลาย ทิ้งไว้จนสารละลายเคลื่อนที่ไปจนถึงระยะ solvent front ประมาณ 18 เซนติเมตร (วัดจากรอย strip) ใช้เวลาประมาณ 8 ชั่วโมงจากนั้นนำไปผึ่งให้แห้งแล้วแบ่งแผ่น chromatogram เป็น Rf 0.1-1.0 (ซึ่งเป็นส่วนที่อยู่เหนือแถบสารจนถึงระยะ solvent front) โดยแบ่งออกเป็น 10 ส่วนเท่า ๆ กัน ส่วน Rf 0.0 จะอยู่ใต้แถบสาร ตัดแบ่งเฉพาะ Rf 0.4-0.9 ซึ่งเป็น Rf ที่พบ activity มาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

7.2 เตรียมอาหารวุ้นตามสูตรของ Miller (1961) แต่ไม่ใส่ kinetin (เตรียมอาหารปริมาตร 2,000 มิลลิลิตร) นำอาหารวุ้นที่เตรียมไว้เทใส่ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ใส่ chromatogram ที่ตัด Rf (0.4-0.9) ใส่ไว้ก่อนแล้วขวดละ 10 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 12 ซ้ำ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดย

ไล่อากาศก่อนเป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงนึ่งที่ความดันประมาณ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นปล่อยให้ความดันภายในหม้อนึ่งลดลงจนเท่ากับภายนอกจึงเปิดหม้อนึ่ง

7.3 นำ hypocotyl ออกมาจากหลอดทดลองในตู้ laminar air flow โดยเปิดฝาพลาสติกออกแล้วลนปากหลอดที่ตะเกียงแอลกอฮอล์แล้วใช้ปากคีบที่นึ่งฆ่าเชื้อ และได้ทำการเผาฆ่าเชื้อแล้วอีกรอบคีบ hypocotyl ออกมา ตัดใน petridish ที่มีแผ่นพลาสติกรองไว้ โดยใช้ใบมีดเบอร์ 11 ที่เผาฆ่าเชื้อแล้วตัดเอาส่วนที่เป็นใบเลี้ยงและส่วนรากทิ้งไปแล้วย้าย hypocotyl ที่ตัดแล้วมาวางลงใน petridish อีกอันที่มีแผ่นพลาสติกรองไว้ แล้วใช้ใบมีดเบอร์ 11 อีกอันตัด hypocotyl ยาวชิ้นละ 1 มิลลิเมตร ใช้ปากคีบที่เผาฆ่าเชื้อแล้วคีบ hypocotyl ที่ตัดแล้วใส่ลงในขวดอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มี chromatogram ของ Rf 0.4-0.9 ขวดละ 8 ชิ้น วางห่างกัน 0.3-0.4 มิลลิเมตร โดยเลือก hypocotyl ทั้งจากส่วนที่ใกล้กับบริเวณใบเลี้ยงหรือส่วนที่ใกล้กับบริเวณรากให้เฉลี่ยกันไปในแต่ละขวดเพื่อจะเป็นการลดความผันแปร (correlation of variance) ของการทดลอง ลนปากขวดที่ตะเกียงแอลกอฮอล์แล้วปิดปากขวดด้วยแผ่นพลาสติก PP (polypropylene) รัดยาง (ทำในสภาพปลอดเชื้อ)

7.4 นำไปบ่มในตู้ควบคุมการเจริญเติบโตอุณหภูมิ 28$\pm$2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสงประมาณ 1,000 lux เป็นเวลา 13 วัน

8 บันทึกผลการทดลอง

8.1 บันทึกน้ำหนักสดของ hypocotyl (เมื่ออายุบ่มเท่ากับ 13 วัน) มีหน่วยเป็น กรัมต่อ hypocotyl 8 ชิ้น

8.2 เทียบหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินจากกราฟมาตรฐานมีหน่วยเป็น µg kinetin equivalent/g f.wt. (ภาคผนวกที่ 3)

8.3 วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Statistix 3.5 ของ NH Analytical Software โดยวิเคราะห์ test of AOV assumption, AOV, CV., LSD, linear regression และ correlation

**สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย**

1. ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. สวนเกษตรกร ต.เหมืองจี้ อ.เมือง จ.ลำพูน
3. สถานีวิจัยศูนย์ฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

**ระยะเวลาในการดำเนินงานวิจัย**

ระหว่างเดือนตุลาคม 2542 ถึงเดือนมกราคม 2544