# บทที่ 3
# อุปกรณ์และวิธีการ

**พืชทดลอง**

มะม่วง (*Mangifera indica* L.) พันธุ์โชคอนันต์อายุ 7-8 ปี

**สารเคมี**

1. Acetic acid (LAB-SCAN ® , Thailand)
2. Diethyl ether (LAB-SCAN ® , Thailand)
3. di-Potassium hydrogen orthophosphate anhydrous AR grade (fisherScientific®, UK)
4. Ethanol (MERCK ® , Germany)
5. 3-indolebutyric acid : IBA (Fluka ® ,Switzerland)
6. Methanol HPLC grade (LAB-SCAN ® , Thailand)
7. Paclobutrazol
8. Potassium dihydrogen orthophosphate AR grade (fisher Scientific®, UK)
9. Polyvinylpyrrolidon : PVP (Sigma ® ,Germany)
10. Tissue freezing medium (Jung ® , Germany)
11. Xylene (LAB-SCAN ® ,Thailand)
12. Nitrogen gas

**อุปกรณ์**

1. เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography : HPLC , SIMADZU ® ,SCL-10A VP, Fluorimeter detector, SIMADZU ® , RF-10A XL, JAPAN)

2. เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography : GC, SIMADZU ® ,14B, JAPAN)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. เครื่องตัดเนื้อเยื่อพืช (Freezing microtome, LEICA ® , CM1850, Germany)

4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centifuge, HERMLE ® ,Z200A,Germany)

5. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH –meter, Sartorius PP-50®,Taiwan)

6. เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ (Microcentifuge, KUBOTA ® , 6930, JAPAN)

7. กล้องจุลทรรศน์ (Olympus ® , BX51, JAPAN)

8. กล้องถ่ายรูป (Olympus ® , BX51, JAPAN)

**วิธีการทดลอง**

**1.การวางแผนการทดลอง**

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) 4 ซ้ำ (3 ต้นต่อซ้ำ)โดยมีกรรมวิธีดังต่อไปนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไม่ราดสาร (control)

กรรมวิธีที่ 2 ราดสารพาโคลบิวทราโซลอัตรา 1.0 กรัมของสารออกฤทธิ์ต่อตารางเมตรทรงพุ่ม

สารพาโคลบิวทราโซล มีชื่อทางการค้า คือ ฟาร์มอร์ 10 นำเข้าและผลิตโดย บริษัท ลัดดา จำกัด อยู่ในรูปผง ซึ่งมีเนื้อสารออกฤทธ์ 10 เปอร์เซ็นต์

**2. การเตรียมต้นมะม่วง**

2.1 การเลือกต้น ทำการทดลอง ณ แปลงทดลองโครงการบ้านโปงอันเนื่องมาจากพระราชดำริ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ โดยใช้ต้นมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ อายุ 7-8 ปี เลือกเส้นผ่าศูนย์กลางทรงพุ่ม 4-5 เมตร (ภาพที่ 6) และมีการแตกใบ 1 ชุดหลังการตัดแต่งกิ่ง จำนวน 24 ต้น

2.2 การบำรุงต้น ใส่ปุ๋ยเคมีเพื่อบำรุงต้น 200 กรัมต่อต้น ดังนี้

- ปุ๋ยเคมีสูตร 46-0-0
- ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15

2.3 การให้น้ำ ในระยะการเตรียมต้นทำการให้น้ำโดยระบบมินิสปริงเกอร์สัปดาห์ละ 1 ครั้ง

2.4 การบังคับให้มะม่วงแตกใบอ่อน ใช้ไทโอยูเรีย 0.5 เปอร์เซ็นต์ พ่นในระยะใบแก่จัดเพื่อกระตุ้นให้มีการแตกตาใหม่ ซึ่งจะสามารถกระตุ้นให้มะม่วงแตกตาได้ภายใน 2 สัปดาห์ เมื่อมะม่วงมีการแตกใบอ่อนแล้วต้องดูแลใบอ่อนให้อยู่ในสภาพสมบูรณ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ภาพที่ 6** ลักษณะของต้นมะม่วงในแปลงทดลอง

**3. การราดสารพาโคลบิวทราโซล** ทำการราดสารเมื่อใบมีอายุระหว่าง 15-30 วัน ในอัตรา 1.0 กรัมของสารออกฤทธิ์ต่อตารางเมตรทรงพุ่ม โดยการละลายสารพาโคลบิวทราโซลกับน้ำประมาณ 10 ลิตร และราดสารบริเวณโคนต้น ห่างจากโคนต้นมะม่วงประมาณ 50 เมตร จากนั้นให้น้ำตามเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

**4. การเก็บตัวอย่าง** เก็บในวันที่ 7, 14, 21, 28, 31, 35, 38, 42, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 72, 78, 81, 88, 92, 98, 110, 120 หลังกรรมวิธี

4.1 การเก็บตัวอย่าง shoot diffusates ในแต่ละครั้งจะเก็บยอดมะม่วงจำนวน 6 ยอดต่อซ้ำ จากนั้นตัดยอดมะม่วงยาว 5 เซนติเมตร (ภาพที่ 7) จุ่มโคนยอดลงในขวดพลาสติกที่มีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตร โดยที่จุ่ม 1 ยอดต่อขวดพลาสติก (ภาพที่ 8) แล้วนำขวดพลาสติกวางในกล่องพลาสติก โดยมีเยื่อกระดาษชุ่มน้ำสองชั้นวางที่ก้นกล่องเพื่อรักษาความชื้นสัมพัทธ์ให้ได้ 80-100 เปอร์เซ็นต์ ปิดฝากล่องให้สนิทและปิดผนึกด้วยกระดาษกาวสีน้ำตาลอีกหนึ่งชั้น (ภาพที่ 9) นำไปเก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส 20 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์จำนวน 60 มิลลิลิตร ใส่ขวดพลาสติกขนาด 60 มิลลิลิตร แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ปริมาณไอเอเอ ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography : HPLC)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ภาพที่ 7** การตัดยอดมะม่วง ยาว 5 เซนติเมตร

**ภาพที่ 8** การจุ่มยอดมะม่วงในขวดพลาสติก
ที่มีฟอสเฟตบัฟเฟอร์

**ภาพที่ 9** การเก็บยอดมะม่วง ในกล่องพลาสติก
ที่มีการรักษาความชื้นสัมพัทธ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

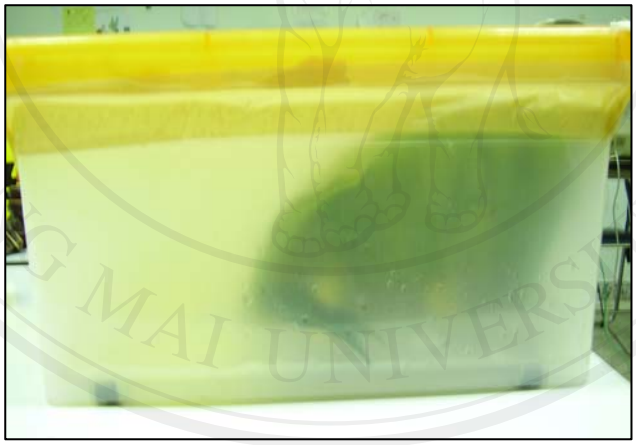
4.2 การเก็บตัวอย่าง leaf diffusates เก็บใบบริเวณรอบๆ ปลายยอดของมะม่วง โดยการใช้ใบมีดตัดที่ก้านใบ (ภาพที่ 10) จากนั้นนำใบมะม่วงจำนวน 2 ใบจุ่มก้านใบลงในถาดหลุมพลาสติก (multi plate) ที่มีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2.5 มิลลิลิตร จำนวน 12 หลุมต่อถาด (ภาพที่ 11) นำถาดหลุมวางในกล่องพลาสติก ที่มีการรักษาความชื้นภายในกล่องความชื้นสัมพัทธ์ให้ได้ 80-100 เปอร์เซ็นต์ โดยการวางเยื่อกระดาษที่ชุ่มน้ำจำนวนสองชั้นที่ก้นกล่อง ปิดฝากล่องให้สนิทและปิดผนึกบริเวณรอยต่อของฝากล่องด้วยกระดาษกาวสีน้ำตาลอีกหนึ่งชั้น (ภาพที่ 12) แล้วเก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส 20 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ใส่ขวดพลาสติกขนาด 60 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ปริมาณไอเอเอ ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography : HPLC)

4.3 การเก็บใบเพื่อวัดปริมาณเอทิลีน เก็บใบบริเวณรอบๆ ปลายยอดของมะม่วง จำนวน 14 ใบ ใส่ในกล่องพลาสติกที่ทราบปริมาตร (ภาพที่ 13) ปิดฝากล่องให้สนิท และปิดผนึกฝากล่องพลาสติกด้วยกระดาษกาวอีกหนึ่งชั้น (ภาพที่ 14) แล้วเก็บในที่มืดอุณหภูมิห้อง 4 ชั่วโมง ใช้เข็มฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดก๊าซจากกล่องพลาสติก (ภาพที่ 15) ทำการวิเคราะห์ปริมาณเอทิลีนด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี (gas chromatography)

**ภาพที่ 10** การตัดใบบริเวณรอบๆ ปลายยอดของมะม่วง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ภาพที่ 11** การจุ่มก้านใบมะม่วงลงในถาดหลุมพลาสติก
ที่มีฟอสเฟตบัฟเฟอร์



**ภาพที่ 12** การเก็บใบมะม่วง ในกล่องพลาสติก
ที่มีการรักษาความชื้นสัมพัทธ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ภาพที่ 13** การเก็บใบมะม่วง เพื่อวัดปริมาณเอทิลีน

**ภาพที่ 14** การบรรจุใบมะม่วงในกล่องพลาสติกที่ทราบปริมาตร

**ภาพที่ 15** การดูดก๊าซจากกล่องพลาสติก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.4 การเก็บปลายยอดมะม่วงเพื่อศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยาของตายอด เก็บปลายยอดมะม่วงหลังราดพาโคลบิวทราโซล ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร และแกะส่วนของกาบหุ่มตายอด (bud scale) ออกให้เหลือเพียงปลายยอดมะม่วงเท่านั้น (shoot tip) แช่ในน้ำยารักษาสภาพ (formalin-acetic acid alcohol; FAA) นาน 1-2 วัน เพื่อทำ freezing microtome section

4.5 การเก็บข้อมูลทางกายภาพ เก็บข้อมูลการออกดอก ได้แก่ จำนวนวันที่ออกดอก เปอร์เซ็นต์การออกดอก และขนาดของช่อดอก หลังราดพาโคลบิวทราโซล เพื่อตรวจสอบการตอบสนองต่อการให้สาร

**5. ขั้นตอนการวิเคราะห์**

5.1 การวิเคราะห์ไอเอเอ

5.1.1 การทำให้บริสุทธิ์ (purification) ละลายตัวอย่าง shoot diffusates และ leaf diffusates ซึ่งในแต่ละซ้ำจะใช้ ยอดมะม่วง 6 ยอด (60 มิลลิลิตร) และใบ 8 ใบ (20 มิลลิลิตร) ให้เป็นของเหลวแล้วเติม internal standard (3-indolebutyric acid : IBA) ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม Polyvinylpyrrolidon (PVP) ประมาณ 20 มิลลิกรัม จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ด้วยเครื่อง centrifuge นาน 10 นาที แยกสารละลายที่ได้ไปปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 2.5-3.0 ด้วย acetic acid ความเข้มข้น 4 โมล แล้วจึงเติม diethyl ether ½ ส่วนของปริมาณตัวอย่าง เขย่านาน 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จะสังเกตเห็นสารละลายแยกชั้น ดูดสารละลายส่วนบนเพื่อนำไประเหยแห้ง แล้วเติม diethyl ether ทำซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไประเหยภายใต้ก๊าซไนโตรเจนจนแห้ง จึงทำละลายด้วย methanol ความเข้มข้น 70% จำนวน 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่อง microcentifuge นาน 15 นาที เทสารละลายใส่หลอดเก็บตัวอย่างขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

5.1.2 วิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ดัดแปลงจากกรรมวิธีของ Koshita and Takahara (2004) ฉีดตัวอย่างที่สกัดปริมาณ 20 ไมโครลิตร โดยตั้งค่าดังต่อไปนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Column : SC-150(150PU.O mm)

Prontosil 120-5-C18 ace-EPS5.0 µm, BISCHOFF Chromatography ®

Mobile phase : A = 0.1M acetic acid in water

B = 0.1M acetic acid in methanol

Time Program :

| Time | Event | Value |
|---|---|---|
| 0.01 | B.Conc. | 45.0 |
| 12.00 | B.Conc. | 85.0 |
| 15.00 | B.Conc. | 100.0 |
| 18.00 | B.Conc. | 45.0 |
| 22.00 | B.Conc. | 45.0 |

Flow rate : 1 ml/min

Detector : fluorimeter detector

5.2 การวิเคราะห์ปริมาณเอทิลีน

5.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณเอทิลีน วัดด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี ตามกรรมวิธีของ Sanyal and Bangerth (1998) โดยดูดกก๊าซในกล่องตัวอย่างที่เก็บในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง นาน 4 ชั่วโมง ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี โดยตั้งค่าเครื่องดังต่อไปนี้

Column : Parapak N 80/100

Condition : Injector temperature 150 ˚C

Detector temperature 150 ˚C

Oven temperature 55 ˚C

Carrier gas : $N_2$

Flow rate : 70 ml/min.

Detector : Flame ionized detector (FID)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.3 การศึกษากายวิภาควิทยาของตายอด

การศึกษาโครงสร้างของตายอด ด้วยวิธี freezing microtome section โดยดัดแปลงจากกรรมวิธีของ Johansen (1940) นำชิ้นส่วนปลายยอดแช่ลงในน้ำยา (tissue freezing medium) นาน 5 นาที เพื่อยึดเนื้อเยื่อ นำไปตัดด้วยเครื่อง freezing microtome ภายใต้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ให้มีชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อมีความหนา 13-15 ไมครอน แล้วนำไปย้อมสี Delafied's hematoxylin ปิดด้วย cover slip บนกระจกสไลด์ โดยใช้ permount เพื่อยึด cover slip เป็นการทำสไลด์ถาวร และบันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved