บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

พืชทดลอง

ลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย (*Litchi chinennsis* Sonn. cv. Hong Huay)

อุปกรณ์

1. ดิจิตอล เวอร์เนียแคลิเปอร์ (digital verneer caliper)
2. เครื่องวัดการสังเคราะห์แสง (Portable Photo Synthesis) (รุ่น LCA-4 Portable Photosynthesis and Transpiration Measurement System)
3. เครื่องวัดการยอมให้ก๊าซผ่านการทำงานของคลอโรฟิลล์ (Chlorophyll fluorescence) (Hansatech Instrument Ltd.,England)
4. เครื่อง Datalogger (Delta-T Devices Ltd, England)
5. เครื่องกลั่นไนโตรเจน (Buchi 323, Switzerland)
6. เตาเผา (Buchi 412, Switzerland)
7. หลอดย่อยตัวอย่าง ขนาด 250 มิลลิลิตร (Buchi 430, Switzerland)
8. เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo®, Switzerland)
9. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Shimadzu® UV-1601, JAPAN)
10. ไมโครปิเปต ขนาด 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (Pipettman Gilson®, Germany)
11. กระดาษชั่งตัวอย่าง
12. ขวดสีชาสำหรับเก็บสารเคมี (Duran®, Germany)
13. ตะแกรงวางหลอดทดลอง
14. ถุงกระดาษ
15. หลอดแก้วทดลอง (test tube)
16. หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตร (centrifuge tube)
17. Pipette Tip ขนาด 20 – 200 และ1,000 ไมโครลิตร (Excellence®)
18. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Hsiangtai, Taiwan)
19. เครื่อง Vortex (Scientifi Industries, USA)
20. Erlenmeyer flask
21. Cuvette แก้ว (Starna, England)
22. Magnetic bar

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

23. Magnetic stirrer
24. Scintillator (UltraGold, Perkin Elmer)
25. Pasture pipette
26. ขวดปรับปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร (ISO LAB®, Germany)
27. กรวยกรอง
28. กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman®, England)
29. กระดาษอลูมิเนียม
30. ขวดพลาสติก 60 มิลลิลิตร
31. เครื่อง Vortex (Scientifi Industries, USA)
32. เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo®, Switzerland)
33. เครื่องทำตัวอย่างแห้งโดยความเย็น (Dura-Stop®, USA)
34. เครื่องบดตัวอย่าง (Philips HR 2021, China)
35. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Shimadzu® UV-1601, JAPAN)
36. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH-meter)(Sartorius Professional Meter® PP-50, USA)
37. ช้อนตักสาร
38. ตะแกรงวางหลอดทดลอง
39. ตู้เย็น
40. โถดูดความชื้น
41. บิกเกอร์ขนาด 50 100 250 1000 และ 2000 มิลลิลิตร
42. ไมโครปิเปต ขนาด 200 1,000 และ5,000 ไมโครลิตร (Pipettman Gilson®, Germany)
43. ลูกยางดูดสาร
44. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert, Germany)
45. หลอดแก้วทดลอง ขนาด 60 มิลลิลิตร
46. ตู้อบ (Memmert, Germany)
47. G4 Glassinner-filter
48. Handy step (Brand, Germany)
49. Hotplate (CE Combination, Thailan)
50. Para film (Parafilm , WI 54952)
51. Speed vacuum concentrator (JOUAN®, RC 1010, Germany)
52. กรองแก้ว filter crucible 50 ml (DURAN®,258513406, Germany)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

53. โกร่งบดตัวอย่าง
54. ขวดก้นกลม (rotary flask)
55. เครื่อง Freeze dryer
56. เครื่อง rotary evaporator (BUCHI Rotavapor R-114, Switzerland)
57. เครื่อง ultrasonic bath (D.S.C. Group, Thailand)
58. เครื่องบดตัวอย่าง
59. เครื่องปั่นเหวี่ยง
60. ช้อนตักสาร
61. ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส
62. ถุงพลาสติกแบบปิดปากได้
63. ถุงมือยาง (Sempermed, Thailand)
64. ไนโตรเจนเหลว
65. หน้ากากปิดจมูก (Star, Thailand)
66. หลอดปั่นเหวี่ยง ขนาด 50 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. Deionized distill water 1 Ω
2. Potassium sulphate (K_2SO_4) (A17-1,Ajax Finechem)
3. Copper (II) sulfate – pentahydrate ($CuSO_4.5H_2O$) (Merck, A501690)
4. Salicylic acid (HOC_6H_4COOH) (Ajacx, A1198)
5. Selenium back (Se) (Merck, 64271)
6. Boric acid (H_3BO_3) (Merck, A779365)
7. Methyl red (6913, Fluka)
8. Bromocresol green (Merck, B/4320/44)
9. Ammonium molybdate ($[(NH_4)]_6\ Mo_7O_{24} . 4H_2O$) (Ajax Finechem, A46)
10. Anhydrous sodium carbonate (Na_2CO_3) (Merck, A836892)
11. Anhydrous sodium sulfate (Na_2SO_4) (Ajax Finechem, A503)
12. Sulfuric acid 98% (H_2SO_4) (Lab Scan, A8301)
13. D-Glucose anhydrous ($C_6H_{12}O_6$) (Ajax Finechem, A783)
14. Disodium hydrogen arsenate ($Na_2HAsO_2 . 7H_2O$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

15. Sodium potassium tartrate ($KNaC_4H_4O_6 . 4H_2O$) (Ajax Finechem, A416)
16. Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) (Ajax Finechem, 476)
17. Sodium hydroxide 97% (NaOH) (Lab-Scan, K2004)
18. ^{3}H-Hormone (tracer)
19. Acetic acid (Labscan, A8401)
20. Ammonium acetate (CH_3COONH_4) (Merck, 1.01116.1000)
21. Ammonium solution 32% (Merck, 1.05426.1000)
22. Ammonium sulphate (Sigma,50722)
23. Calf serum
24. DEAE-sephadex (Sigma, A25120)
25. Ehereal diazometane
26. Methanol (CH_3OH) (Lab-Scan, A3513)
27. Sodium chloride (NaCl) (Merck, 1.06404.1000)
28. Poly (vinylpolypyrrolidone) - PVP (Sigma, P6755)
29. Sep-Pak-C_{18} (Sep-Pak Classic, Ireland)
30. Sulfuric acid 98% (H_2SO_4) (Lab-Scan, A8301)
31. Diethyl ether (Labscan, A3509)
32. Trimethylsilyl diazomethane sulution ($C_4H_{10}N_2Si$) (Fluka, 92738)

วิธีการทดลอง

1. แผนการดำเนินงาน

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองคือ

การทดลองที่ 1 ทำการทดลองที่ระดับความสูง 750 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล แบ่งการทดลองได้ 2 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 : กลุ่มควบคุม (ไม่ควั่นกิ่ง) จำนวน 4 ต้น

กรรมวิธีที่ 2 : ควั่นกิ่ง ทำการควั่นกิ่งของต้นลิ้นจี่ จำนวน 4 ต้น ทำการควั่นกิ่งในวันที่ 1 ตุลาคม 2550

การทดลองที่ 2 ทำการทดลองที่ระดับความสูง 1,200 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล แบ่งการทดลองได้ 2 กรรมวิธี คือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 1 : กลุ่มควบคุม (ไม่ควั่นกิ่ง) จำนวน 4 ต้น

กรรมวิธีที่ 2 : ควั่นกิ่ง ทำการควั่นกิ่งของต้นลิ้นจี่ จำนวน 4 ต้น ทำการควั่นกิ่งในวันที่ 26 เมษายน 2551

แต่ละการทดลองเปรียบเทียบกรรมวิธีแบบ T-test ทำการทดลอง 4 ซ้ำ (1 ต้นต่อ 1 ซ้ำ)

2. การเตรียมต้นลิ้นจี่

การทดลองที่ 1 ที่ระดับความสูง 750 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล เลือกต้นลิ้นจี่ พันธุ์ฮงฮวยที่มีความสมบูรณ์ อายุ 25 ปี จากแปลงเกษตรกร บ้านแม่สาใหม่ ต.โป่งแยง อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ จำนวน 8 ต้น แล้วทำการตัดแต่งกิ่งประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเตรียมต้น (ภาพที่ 4) ในวันที่ 12 มิถุนายน 2550

การทดลองที่ 2 ที่ระดับความสูง 1,200 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล เลือกต้นลิ้นจี่ พันธุ์ฮงฮวยที่มีความสมบรูณ์ อายุ 25 ปี จากแปลงเกษตรกร บ้านผากลอง ต.โป่งแยง อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ จำนวน 8 ต้น แล้วทำการตัดแต่งกิ่งประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเตรียมต้น (ภาพที่ 4) ในวันที่ 8 สิงหาคม 2550

(ก) (ข)

ภาพที่ 4 (ก) การตัดแต่งกิ่งที่ระดับความสูง 750 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล และ (ข) การตัดแต่งกิ่งที่ระดับความสูง 1,200 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การบำรุงต้น

ใส่ปุ๋ยคอกต้นละ 1 กระสอบ (ประมาณ 15-20 กิโลกรัม) ต่อต้นหลังการตัดแต่งกิ่ง และใช้ปุ๋ยเคมีโดยแบ่งใส่ 2 ช่วง คือ

ช่วงที่ 1 : หลังการตัดแต่งกิ่งใช้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ผสมกับปุ๋ยยูเรีย สูตร 46-0-0 อย่างละครึ่ง แบ่งใส่ต้นละ 5 กิโลกรัม

ช่วงที่ 2 : ใบชุดที่ 1 แก่ ใช้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 อย่างเดียว แบ่งใส่ต้นละ 5 กิโลกรัม

ให้น้ำทุก 1-2 สัปดาห์ จนถึงช่วงก่อนการออกดอกประมาณ 1-2 เดือน จึงงดให้น้ำและปุ๋ย หลังจากนั้นเปิดโคลนต้นเพื่อให้ดินใต้ทรงพุ่มได้รับแสงช่วยทำให้ความชื้นในดินลดลง

4. การควั่นกิ่ง

ทำการควั่นกิ่งต้นลิ้นจี่ในระยะที่ใบเพสลาดใกล้แก่ (ภาพที่ 5) โดยเลือกกิ่งที่แตกออกมาจากกิ่งหลัก (limb) ที่มีส่วนกลมมากที่สุด ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-8 นิ้ว ใช้เลื่อยโค้งเลื่อยกิ่งให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.0 มิลลิเมตร ให้ฟันเลื่อยทะลุเปลือกไปถึงเนื้อเยื่อเจริญเท่านั้น (ภาพที่ 6) (อนันต์, 2547)

ภาพที่ 5 ต้นลิ้นจี่ที่ใบเพสลาดเริ่มแก่เหมาะสำหรับการควั่นกิ่ง

ภาพที่ 6 การควั่นกิ่งต้นลิ้นจี่โดยใช้เลื่อยโค้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การเก็บตัวอย่าง (Sample Collections)

วันที่เก็บตัวอย่างของการทดลองที่ 1 (ตารางที่ 1) และวันที่เก็บตัวอย่างของการทดลองที่ 2 (ตารางที่ 2) ซึ่งทั้ง 2 การทดลองจะมีวิธีการเก็บตัวอย่างและการเก็บข้อมูลเหมือนกันดังนี้

5.1 การเก็บใบเพื่อวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน โดยเก็บใบแก่จากใบประกอบคู่ที่ 4 ลงมา (นับจากปลายยอด) (ภาพที่ 7) จำนวน 20 ใบ ห่างกัน 2 สัปดาห์ แล้วนำมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน บดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องปั่นเสร็จแล้วนำมาใส่ในถุงกระดาษเพื่อรอการวิเคราะห์โดยวิธี Macro-Kjeldahl

5.2 การเก็บใบและกิ่งเพื่อวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้าง โดยเก็บใบประกอบคู่ที่ 3-4 จำนวน 20 ใบ (ภาพที่ 7) ส่วนกิ่งตัดจากข้อที่ 3 ลงมาประมาณ 3 ข้อ จำนวน 20 ปล้องแล้วใส่ไนโตรเจนเหลวเก็บใส่ในถุงกระดาษ ส่วนตัวอย่างใบบดให้ละเอียดพอประมาณเก็บใส่ในถุงกระดาษ แช่ในตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส แล้วนำไปทำให้แห้งโดยใช้ความเย็นจากเครื่อง freeze drier หลังจากนั้นนำตัวอย่างใบบดให้ละเอียดอีกครั้งผ่านตะแกรงกรอง ส่วนตัวอย่างกิ่งแยกเอาเปลือกของเนื้อไม้และเปลือกไม้ออกจากกัน (ภาพที่ 8) บดให้ละเอียดแล้วทำการวิเคราะห์ TNC ตามวิธีของ (Hodge and Hofreiter, 1962) ที่ดัดแปลงโดย (สุจริต, 2531)

ตารางที่ 1 วันที่เก็บตัวอย่าง และจำนวนวันหลังการควั่นกิ่งจนถึงระยะออกดอก ที่ระดับความสูง 750 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล

วันที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนวันหลังการควั่นกิ่ง
1 ตุลาคม 2550*	0**
17 ตุลาคม 2550	16
31 ตุลาคม 2550	30
14 พฤศจิกายน 2550	44
28 พฤศจิกายน 2550	58
12 ธันวาคม 2550***	72
26 ธันวาคม 2550	86
9 มกราคม 2551	100

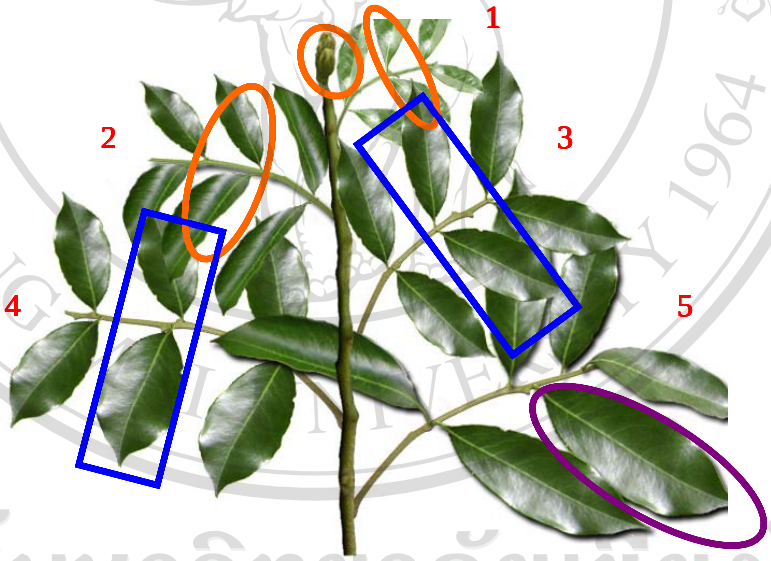
หมายเหตุ : * วันที่ควั่นกิ่ง **ไม่ได้เก็บตัวอย่าง ***วันที่ออกดอก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 วันที่เก็บตัวอย่าง และจำนวนวันหลังการควั่นกิ่งจนถึงระยะออกดอก ที่ระดับความสูง 1,200 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล

วันที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนวันหลังการควั่นกิ่ง
26 เมษายน 2551*	0
10 พฤษภาคม 2551	14
24 พฤษภาคม 2551	28
7 มิถุนายน 2551	42
14 มิถุนายน 2551	49
21 มิถุนายน 2551**	56
28 มิถุนายน 2551	64

หมายเหตุ : * วันที่ควั่นกิ่ง **วันออกดอก



ภาพที่ 7 ตำแหน่งใบที่ใช้เก็บตัวอย่าง (รูปวงกลมสีส้มใช้วิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน รูปสี่เหลี่ยมสีน้ำเงินใช้วิเคราะห์ปริมาณ TNC วงกลมสีม่วงใช้วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน; ตัวเลขบ่งบอกถึงตำแหน่งของใบประกอบ)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.3 การเก็บปลายยอดและใบเพื่อวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน โดยสุ่มเก็บตายอดครั้งละ 25 ยอดต่อต้น ใส่ลงในไนโตรเจนเหลวทันที จากนั้น นำตัวอย่างเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำไปทำให้แห้งโดยใช้ความเย็นโดยเครื่อง freeze drier แล้วนำตัวอย่างเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

อีกครั้ง เพื่อรอการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนไอเอเอ และไซโตไคนินด้วยวิธี Radioimmunoassay (RIA)

(ก) (ข) (ค)

ภาพที่ 8 (ก) กิ่งลิ้นจี่ หลัง freeze dry (ข) แยกเนื้อไม้ และ (ค) แยกส่วนเปลือก ออกจากกันเพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณ TNC

6. วัดการเจริญทางด้านสรีระวิทยา

วัดการเจริญทางด้านสรีระวิทยาหลังการควั่นกิ่งโดยวัดอัตราการสังเคราะห์แสง ค่าการยอมให้ก๊าซผ่านของปากใบ และอัตราการคายน้ำของใบ โดยใช้เครื่อง Portable Photo Synthesis (ภาพที่ 9) และเครื่องวัดประสิทธิภาพการทำงานของคลอโรฟิลล์โดยใช้เครื่อง Chlorophyll fluorescence (ภาพที่ 10) สุ่มวัดใบที่เจริญเต็มที่ ของใบประกอบคู่ที่ 3 ต้นละ 8 ใบ ทำการวัดทุก 2 สัปดาห์ในช่วงเวลา 10.00-12.00 น. จนถึงระยะออกดอก

(ก) (ข)

ภาพที่ 9 (ก) เครื่องวัดอัตราการสังเคราะห์แสง (Portable Photo Synthesis) และ(ข) การวัดอัตราการสังเคราะห์แสงของใบลิ้นจี่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(ก) (ข)

ภาพที่ 10 (ก) เครื่อง Chlorophyll fluorescence และ (ข) การใช้เครื่อง Chlorophyll fluorescence วัดใบลิ้นจี่

7. การเก็บข้อมูลทางกายภาพได้แก่

7.1 จำนวนครั้งในการแตกใบอ่อน และจำนวนวันที่ตายอดผลิจนถึงวันที่ใบเริ่มแก่

7.2 วันที่ออกดอก และเริ่มติดผล

7.3 เปอร์เซ็นต์การออกดอกต่อต้นรอบทรงพุ่ม

7.4 วัดขนาดช่อดอก โดยวัดความยาว และความกว้างของช่อดอก

7.5 บันทึกสัดส่วนของเพศดอก

7.6 วัดการเจริญเติบโตของผลทุกๆ 2 สัปดาห์โดยใช้ ดิจิตอล เวอร์เนียแคลิปเปอร์(digital verneer caliper) วัดส่วนที่กว้างที่สุดของผลในแต่ละช่อดอกเมื่อผลมีขนาดเท่าหัวไม้ขีดไฟ

8. การวิเคราะห์ไนโตรเจนในใบพืช

8.1 การย่อยตัวอย่าง

1) ชั่งตัวอย่างพืช 0.50 กรัม ใส่หลอดสำหรับย่อยตัวอย่าง เติมสารเร่งการย่อย (Mixcatalyze) จำนวน 1.1 กรัม ซึ่งสารเร่งการย่อยประกอบด้วย

K_2SO_4	100 g
$CuSO_4.5H_2O$	10 g
Salicylic acid	10 g
Se	1 g

2) เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น จำนวน 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดย่อยตัวอย่างนำไปตั้งบนเตาย่อยที่อุณหภูมิ 360-400 องศาเซลเซียส โดยการปรับเพิ่มอุณหภูมิ (ตารางที่ 3) จนกระทั่งการย่อยเสร็จสมบูรณ์ใช้ระยะเวลาประมาณ 5-6 ชั่วโมง (ควรเปลี่ยนเป็นสารละลายใส)

3) ตั้งทิ้งให้เย็นเพื่อวิเคราะห์ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8.2 การกลั่นไนโตรเจน

1) การเตรียมสารละลาย 2% boric acid – indicator (2% H_3BO_3) เตรียมโดยชั่ง H_3BO_3 จำนวน 20 กรัม ใส่ในบิกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจำนวน 200 มิลลิลิตรนำไปอุ่นเพื่อให้ H_3BO_3 ละลายจนหมด จากนั้นเติมน้ำกลั่นอีก 600 มิลลิลิตร ปล่อยไว้ให้เย็น เติม mixed indicator

ตารางที่ 3 การปรับอุณหภูมิเตาย่อยตัวอย่าง

หมายเลข 2*	นาน 2 ชั่วโมง
หมายเลข 4	นาน 2 ชั่วโมง
หมายเลข 6	นาน 1 ชั่วโมง
หมายเลข 8	นาน 1 ชั่วโมง

หมายเหตุ : *การปรับหมายเลขอุณหภูมิไม่สามารถอ่านค่าอุณหภูมิได้แต่เป็นการปรับเพื่อเพิ่มอุณหภูมิ

2) การเตรียม mixed indicator เตรียมโดยชั่ง methyl red 0.0660 กรัม และ bromcresol green 0.0990 กรัม ละลายใน ethanol จำนวน 100 มิลลิลิตร จำนวน 20 มิลลิลิตร ปรับ pH ของสารละลายให้เป็น 5.0 โดยใช้ NaOH 0.1 N หรือ HCl 0.1 N จะได้สีของสารละลายเป็นสีม่วงแดง ทดสอบว่าสีของสารละลายใช้ได้หรือไม่ โดยการนำสารละลาย boric acid – indicator จำนวน 10 มิลลิลิตรใส่ในกระบอกตวงแล้วเติมน้ำกลั่นลงไป 10 มิลลิลิตร สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีม่วงแดงเป็นสีเขียวทันที แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร (เนาวรัตน์, 2527)

3) การกลั่นวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Bremner, 1996) ใช้ volumetric pipette ขนาด 25 มิลลิลิตร ดูดสารละลายที่ย่อยได้นำมาใส่ในหลอดกลั่นแล้วนำมาต่อเข้ากับเครื่องกลั่นไนโตรเจนเทสารละลาย boric acid – indicator (สีม่วงแดง) จำนวน 15 มิลลิลิตร ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 125 มิลลิลิตร มารองรับของเหลวที่ได้รับจากการกลั่น ประมาณ 75 มิลลิลิตร ใต้ condenser ของเครื่องกลั่นไนโตรเจน โดยให้ปลายท่อของเครื่องกลั่นไนโตรเจนสัมผัสกับ สารละลาย boric acid – indicator (ภาพที่ 11ก) เครื่องกลั่นไนโตรเจนจะดูดสารละลาย 40% NaOH จากถังข้างนอก 20 มิลลิลิตร ผ่านเข้าไปยังตัวอย่างที่อยู่ในหลอดทดลอง สารละลายที่ได้จะทำปฏิกิริยากับ boric acid – indicator จะได้สารละลายที่มีสีเขียว (ภาพที่ 11ข) นำมาไตเตรตกับ standard H_2SO_4 0.005 N จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงแดง (ภาพที่ 11ค) บันทึกปริมาตรของ H_2SO_4 ที่ใช้ในการ ไตเตรตและนำมาคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด จากสมการดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$$\text{Total N (\%)} = \frac{(V_s - V_b) \times N \times 14 \times V_d \times 100}{1000 \times V_a \times W}$$

V_s = ปริมาตร standard H_2SO_4 ที่ใช้ไตเตรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

V_b = ปริมาตร standard H_2SO_4 ที่ใช้ไตเตรต blank (มิลลิลิตร)

V_d = ปริมาตรสารละลายทั้งหมดที่ได้จากการย่อยพืช (มิลลิลิตร)

V_a = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ (มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักตัวอย่างพืชที่ใช้วิเคราะห์ (กรัม)

(ก) (ข) (ค)

ภาพที่ 11 (ก) การกลั่นไนโตรเจน (ข) สารละลายที่ได้จากการกลั่นก่อนนำมาไตรเตรทกับ H_2SO_4 และ (ค) สารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงแดงหลังจากที่นำมาไตรเตรทกับ H_2SO_4

9. การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้างจากใบ (total non-structural carbohydrate; TNC)

9.1 วิธีการสกัด

การสกัด TNC จากตัวอย่างพืชจะใช้สารละลายกรดเจือจาง (0.2N H_2SO_4) ตามวิธีการของ Smith *et al*. (1964) โดยนำตัวอย่างพืชที่บดละเอียดและปราศจากความชื้นไปชั่งน้ำหนัก 0.05 กรัม ใส่ลงไปในหลอดทดลองแก้ว ขนาด 60 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริก 0.2 N ลงไป 40 มิลลิลิตร แล้วนำกระดาษอลูมิเนียมปิดปากหลอดทดลอง ก่อนนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างมาแช่ในน้ำเพื่อลดอุณหภูมิ แล้วปรับ pH ให้เป็นกลาง (pH = 7.0) ด้วย NaOH ความเข้มข้น 1M และ 0.1M หรือ H_2SO_4 ความเข้มข้น 0.2 N จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 50

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นในกรวยปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บสารละลายที่ได้ไว้ในขวดพลาสติกขนาด 60 มิลลิลิตรและนำไปแช่ตู้เย็น เพื่อรอวิเคราะห์ต่อไป

9.2 การเตรียมสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน

สารละลายน้ำตาลมาตรฐานเตรียมโดยดูดสารละลาย D-Glucose เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมา 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดสอบขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้สารละลายน้ำตาลมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.025, 0.050, 0.075, 0.100, 0.125, 0.150, 0.175, 0.200, 0.225 และ 0.250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (วิทยา, 2537)

9.3 วิธีการวิเคราะห์

1) การเตรียมกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยนำสารละลายน้ำตาลมาตรฐานที่เตรียมไว้ใส่หลอดทดสอบปริมาณ 1 มิลลิลิตร เติม Nelson's alkaline copper reagent ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดีแล้ว ปิดด้วยกระดาษอะลูมิเนียม นำหลอดแช่ใน water bath อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีโดยวางลงในน้ำเย็น เมื่อหลอดเย็นแล้วเติมสารละลาย arsenomolybdic acid ลงหลอดละ 1 มิลลิลิตร เขย่าเพื่อให้ตกตะกอนของ copper sulfate ($CuSO_4$) ละลายจนหมด เติมน้ำกลั่น 7 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันอีกครั้ง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปอ่านค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (absorbance) โดยใช้ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเขียนเป็นกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของ glucose (แกน X) กับค่า absorbance (แกนY) (ภาพที่ 12)

2) การวิเคราะห์ปริมาณTNC ในตัวอย่างนำสารละลายที่สกัดได้จากตัวอย่างใส่หลอดทดสอบ 1 มิลลิลิตร ทำเช่นเดียวกับการเตรียมกราฟมาตรฐาน นำค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ทำไว้แล้วคำนวณปริมาตรเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ D-glucose ต่อน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง

3) วิธีคำนวณ

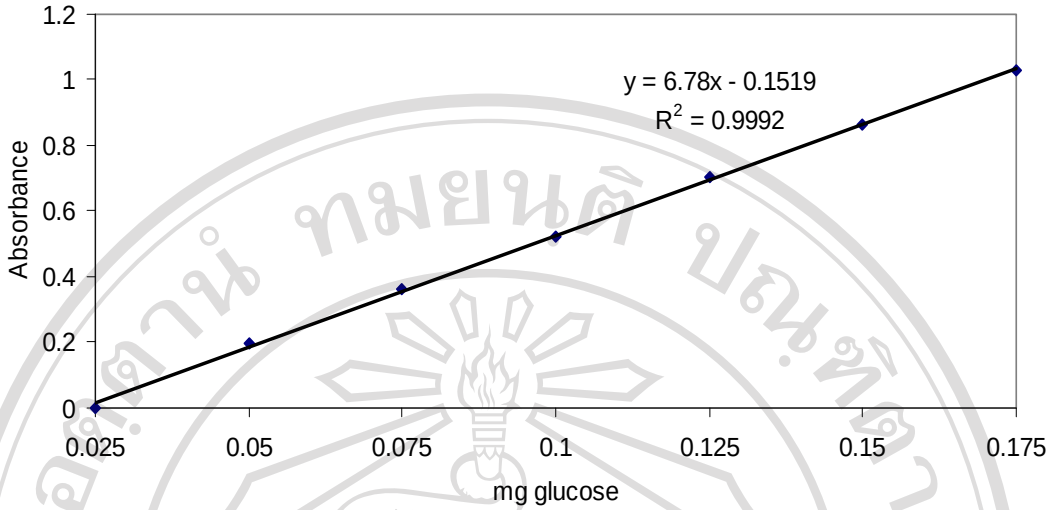
$$TNC = \frac{\text{mg glucose equivalent x vol make}}{\text{Wt. of sample x vol take}}$$

vol make = ปริมาตรสุดท้ายหลังจากปรับ pH ให้เป็นกลาง (50 มิลลิลิตร)

vol take = ปริมาตรของสารละลายที่ใช้ทดสอบค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (1 มิลลิลิตร)

mg glucose equivalent =คำนวณได้มาจากกราฟมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 12 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณ TNC

10. การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืช

10.1 การสกัดตัวอย่างพืช (plant sample extraction)

1) นำตัวอย่างพืชที่เก็บไว้ไปทำให้แห้งด้วยความเย็นภายใต้สภาพสุญญากาศ ด้วยเครื่อง freeze dryer ชั่งน้ำหนักตัวอย่างพืชโดยตัวอย่างใบใช้ 0.3 กรัม ส่วนตัวอย่างยอดใช้ 0.06-0.08 กรัม (ภาพที่ 13) เสร็จแล้วบดตัวอย่างพืชให้ละเอียดด้วยโกร่ง โดยเติมไนโตรเจนเหลวขณะทำการบด เพื่อรักษาสภาพความเย็น (ภาพที่ 14)

2) เติมเมทธานอลเย็น (เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส) ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 50 มิลลิลิตร

3) เก็บสารสกัดใส่ขวดปิดฝาไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง กรองสารสกัดด้วย grassinter-filter ลงในขวดก้นกลม (rotary flask) นำสารละลายไประเหยแห้งด้วย Rotary evaporator (<40°C) จนสารละลายเหลือประมาณ 5 มิลลิลิตร (ภาพที่ 15)

4) ล้างสารสกัดในขวดก้นกลมด้วย ammonium acetate 0.01 M จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 4 มิลลิลิตร โดยใช้ ultrasonic bath

5) เก็บสารละลาย ammonium acetate ที่ได้ทั้ง 18 มิลลิลิตรรวมกันในหลอดปั่นเหวี่ยง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง

6) นำสารสกัดตัวอย่างที่ -20 °C มาละลายให้เป็นของเหลว แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,500 รอบต่อนาทีนาน 30 นาที ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเทส่วนใส (supernatant) ลงในขวดแก้ว ขนาด 30 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7) นำสารสกัด เทผ่านคอลัมน์และ Sep-Pak-C_{18} ซึ่งเป็นการทำสารสกัดพืชให้บริสุทธิ์ (Jiménez and Bangerth, 2001) โดยวิธีการเตรียมดังต่อไปนี้

(ก) **(ข)**

ภาพที่ 13 (ก) ตัวอย่างยอดหลังจากที่ freeze dry แล้ว (ข) เลือกเอาเฉพาะตายอดเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ฮอร์โมน

ภาพที่ 14 การบดและการสกัดตัวอย่างพืช

ภาพที่ 15 การกรองและการระเหยแห้งสารสกัดตัวอย่างพืช

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

10.2 การเตรียมคอลัมน์

คอลัมน์ประกอบด้วย 3 ส่วนคือ

1) หลอดบรรจุสารละลาย (reservoir)

2) หลอดบรรจุ PVP (Polyvinylpyrrolidone)

3) หลอดบรรจุ DEAE-sephadex (anion exchange)

4) Sep-Pak-C_{18}

โดยระหว่างหลอดจะมีวาล์วบังคับการไหลของสารละลาย (ภาพที่ 16) เริ่มต้นโดยเติม PVP 10 มิลลิลิตร ใช้กับตัวอย่างใบ และเติม PVP 20 มิลลิลิตร ใช้กับตัวอย่างยอด เนื่องจากในยอดมีสารAntioxidant มากกว่าในใบ ส่วนในหลอดที่ 2 และเติม DEAE-sephadex 4 มิลลิลิตร ในหลอดที่ 3 ทิ้งไว้ 30 นาที นำหลอดที่ 1, 2 และ 3 มาต่อกัน (ยังไม่ใช้ Sep-Pak-C_{18} cartridge) จากนั้นเติม 0.1 M ammonium acetate pH 8.5 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 1 เปิดวาล์ว ให้สารละลายไหลผ่าน PVP ในหลอดที่ 2 และ DEAE-sephadex ในหลอดที่ 3 และปล่อยสารละลายทิ้งไปจนหมด ปิดวาล์ว (ระวังอย่าให้ PVP และ DEAE-sephadex แห้ง) จากนั้นเติม 0.01 M ammonium acetate pH 7.5 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 1 เปิดวาล์ว ให้สายละลายไหลลงผ่าน PVP ในหลอดที่ 2 และ DEAE-sephadex ในหลอดที่ 3 และปล่อยสารละลายทิ้งไปจนหมด ปิดวาล์ว (ระวังอย่าให้ PVP และ DEAE-sephadex แห้ง)

10.3 การปรับสภาพของ Sep-Pak-C_{18}cartridge ก่อนการใช้งาน

Cytokinins

- ผ่านเมทานอล (100%) ปริมาณ 4 มิลลิลิตร 2 ครั้ง
- ผ่าน 0.01 M ammonium acetate pH 7.5 ปริมาณ 4 มิลลิลิตร 2 ครั้ง

IAA

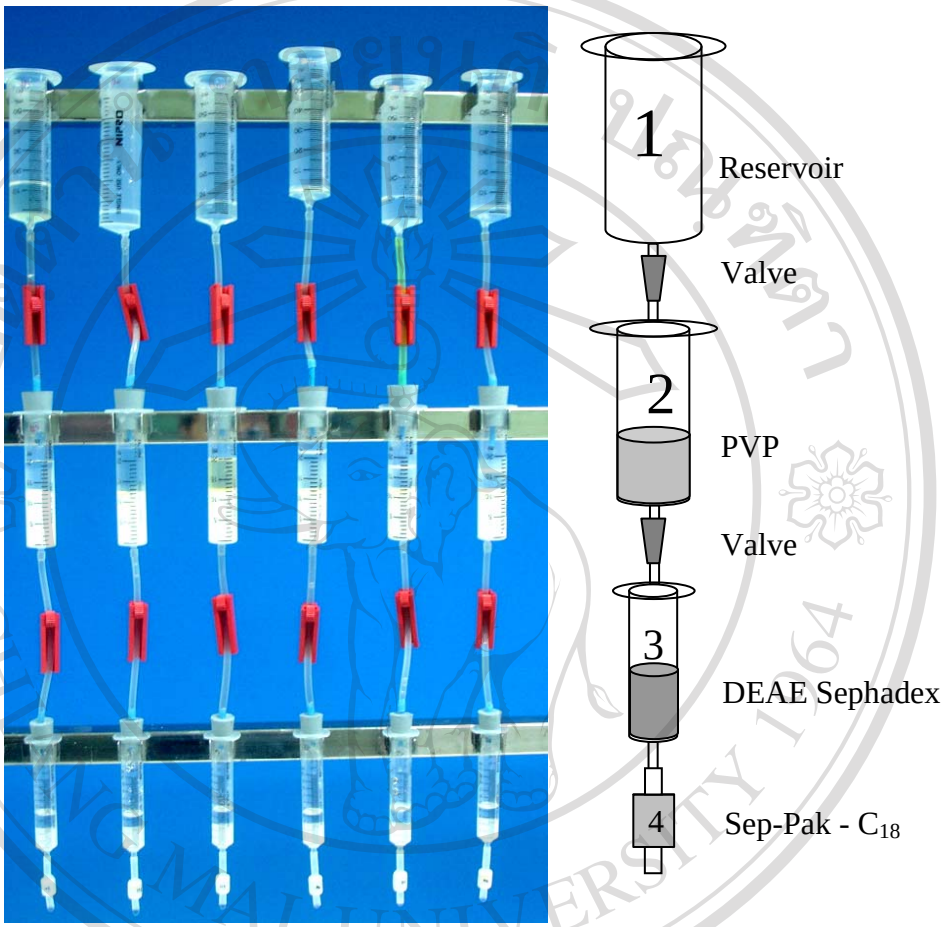
- ผ่านเมทานอล (100%) ใน 0.1 M acetic acid ปริมาณ 4 มิลลิลิตร 2 ครั้ง
- ผ่าน 0.1 M acetic acid ปริมาณ 4 มิลลิลิตร 2 ครั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

10.4 การทำให้บริสุทธิ์ของสารละลายตัวอย่าง

1) นำ cytokinin Sep-Pak-C_{18} ที่เตรียมไว้ ต่อเข้าที่ปลายคอลัมน์ นำสารสกัดที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงเรียบร้อยแล้ว เติมลงในหลอดที่ 1 (reservoir) เปิดวาล์วให้สารสกัดไหลลงผ่านคอลัมน์จนหมด แล้ว ล้างขวดสารสกัดตัวอย่างซ้ำอีก 3 ครั้ง ด้วย 0.01 M ammonium acetate pH 7.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผ่านลงในคอลัมน์ปล่อยสารละลายไหลผ่านจนหมด (ระวังไม่ให้สารละลาย

ในระบบแห้ง) เมื่อถึงขั้นตอนนี้ ฮอร์โมนกรด IAA จะถูกจับอยู่ที่ DEAE-sephadex ส่วน cytokinin จะถูกจับอยู่ใน Sep-Pak-C_{18}



ภาพที่ 16 ส่วนประกอบของคอลัมน์ในการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืช

2) ถอด cytokinin Sep-Pak-C_{18} ออกจากคอลัมน์ ปิดปลายคอลัมน์หลอดที่ 3 ด้วย septum ถอดเอาหลอดที่ 2 (PVP) ออกไป จัดคอลัมน์ใหม่เหลือเฉพาะ หลอดที่ 1 (reservoir) และหลอดที่ 3 (DEAE-sephadex) ต่อกัน IAA Sep-Pak-C_{18} ที่เตรียมไว้ ต่อเข้าที่ปลายคอลัมน์ในหลอดที่ 3 ชะ IAA จาก DEAE-sephadex ลงสู่ Sep-Pak-C_{18} ด้วย 2 M acetic acid ปริมาณ 15 มิลลิลิตร

3) การชะฮอร์โมนออกจาก Sep-Pak-C_{18} ทำโดย

- ล้าง Sep-Pak-C_{18} ด้วยสารละลายเมทานอลใน 0.1 M acetic acid ปริมาณ 4 มิลลิลิตร
- ล้างด้วย 15 % Methanol in acetic acid ปริมาณ 4 มิลลิลิตร
- จากนั้นล้างเอาฮอร์โมนออกจาก Sep-Pak-C_{18} ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Z/ZR 30 % methanol in 0.1 M acetic acid ปริมาณ 4 มิลลิลิตร

i-Ado/i-Ade 80 % methanol in 0.1 M acetic acid ปริมาณ 4 มิลลิลิตร

IAA 40 % methanol in 0.1 M acetic acid ปริมาณ 4 มิลลิลิตร

เมื่อชะเอาฮอร์โมนออกเรียบร้อยแล้วจึงล้าง Sep-Pak-C_{18} ให้สะอาดเพื่อนำมาใช้งานครั้งต่อไปดังนี้

- ล้างด้วย 100 % Methanol ปริมาณ 4 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง
- และล้างด้วย Diethyl ether ปริมาณ 4 มิลลิลิตรจำนวน 1 ครั้ง

เมื่อเสร็จสิ้นขบวนการจะได้สารละลายฮอร์โมนชนิดต่างๆ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอดตัวอย่างไประเหยแห้งในเครื่อง speed vacuum concentrator เพื่อรอการวิเคราะห์ปริมาณโดยวิธี Radioimmunoassay (RIA) ต่อไป

10.5 การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืชด้วยวิธี Radioimmunoassay (RIA)

10.5.1 ตัวอย่างที่ต้องการตรวจวัด

1) เตรียมหลอดแก้วขนาดความยาว 60 มิลลิลิตร เรียงลงใน rack นำสารตัวอย่างที่ได้จากการสกัดนำมา aliquot ลงในหลอดแก้ว ปริมาตร 100-500 ไมโครลิตร (ขึ้นอยู่กับฮอร์โมนแต่ละชนิด) โดยทำ 3 ซ้ำ (triplicate) ในแต่ละปริมาตร นำหลอดตัวอย่างไประเหยแห้งในเครื่อง speed vacuum concentrator

2) สำหรับฮอร์โมนกรด (IAA) ต้องนำมาทำ methylation โดยเติม Trimethylsilyl diazomethane 30 ไมโครลิตร ปิดฝาหลอดบ่มในที่มืด 30 นาที จากนั้นนำไปใส่ในโถดูดความชื้นซึ่งต่อเข้ากับท่อน้ำจากนั้นเปิดฝาหลอดแล้วปิดฝาโถดูดความชื้นเปิดวาล์วน้ำเพื่อให้น้ำเป็นตัวพาให้สาร Trimethylsilyl diazomethane ระเหยออกไป ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 30 นาที (ต้องทำในตู้ดูดควันเท่านั้นเนื่องจากสาร Trimethylsilyl diazomethane เป็นสารก่อมะเร็งที่มีฤทธิ์รุนแรง)

10.5.2 การเติมสารต่างๆ เพื่อเป็นตัวควบคุมทางเทคนิค

	Bo	NSB	Bx	To
Buffer	+	+	+	-
Calf serum	+	+	+	-
H-Hormone	+	+	+	+
Antibody	+	-	+	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Bx: bound activity in presence of sample Bo: maximum bound activity

NSB: non specific binding To: total radioactivity added

- การคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยวของแอนติบอดีกับสารรังสี (% Binding)

$$\% \text{ bound radioactivity} = \frac{100(Bx-NSB)}{(Bo-NSB)}$$

10.5.3 ขั้นตอนการตรวจวัด

1) เติม phosphate buffer ลงในหลอดแก้วทั้งหมดที่วางเรียงในที่วางหลอดทดลอง และเขย่าที่ 1,200 rpm

2) เติม serum, ^{3}H-Hormone และ antibody ตามตารางข้อ 3 เขย่าที่ 1,200 rpm บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ในระหว่างบ่ม เขย่าที่ 1,200 rpm อีก 1 ครั้ง(หลังจากครั้งแรก 15 นาที)

3) เติม ammonium sulfate 90% ปริมาตร 750 µl เขย่า ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้โปรตีนตกตะกอน

4) นำหลอดแก้วไปหมุนเหวี่ยงที่ 4000 rpm 40 นาที

5) เทส่วน supernatant ทิ้งลงในภาชนะจัดเก็บสารกัมมันตรังสี ซับปากหลอดแก้วโดยคว่ำ rack ลงบนกระดาษชำระ

6) เติม ammonium sulfate 50% ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำหลอดแก้วไปหมุนเหวี่ยงที่ 4,000 rpm 30 นาที

7) เทส่วน supernatant ทิ้งลงในภาชนะจัดเก็บสารกัมมันตรังสี ซับปากหลอดแก้วโดยคว่ำที่วางหลอดทดลองลงบนกระดาษชำระ

8) เติมน้ำกลั่น 200 ไมโครลิตร แล้วเขย่า

9) เติม scintillator (UltraGold, Perkin Elmer) ปิดฝาหลอดแก้วให้แน่น ด้วย plastic stoppers

10) เขย่าให้สารละลายผสมกัน นำไปวัดค่ากัมมันตรังสี

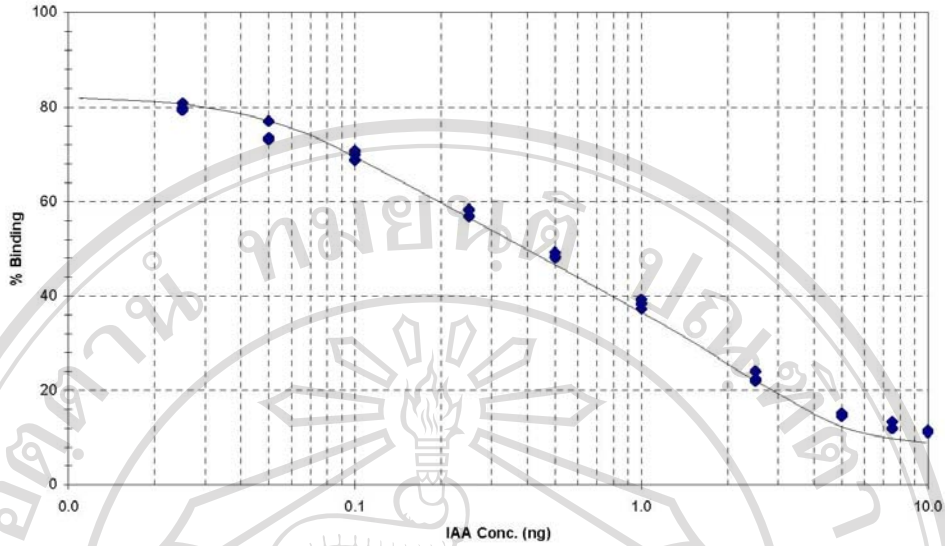
11) คำนวณค่าจากกราฟมาตรฐาน ของฮอร์โมนแต่ละชนิด (หัวข้อที่ 10.5.4 (ภาพที่ 14 15 และภาพที่ 16))

10.5.4 กราฟมาตรฐานในการตรวจวัดฮอร์โมน IAA iP/iPA และ Z/ZR ด้วยวิธี RIA

1) กราฟมาตรฐานในตรวจวัดฮอร์โมน IAA

จากกราฟมาตรฐาน IAA ที่ได้ค่า 50% binding เท่ากับ 0.5 นาโนกรัม และช่วงที่สามารถตรวจวัด IAA ได้แม่นยำอยู่ในช่วง 5.0-0.05 นาโนกรัม

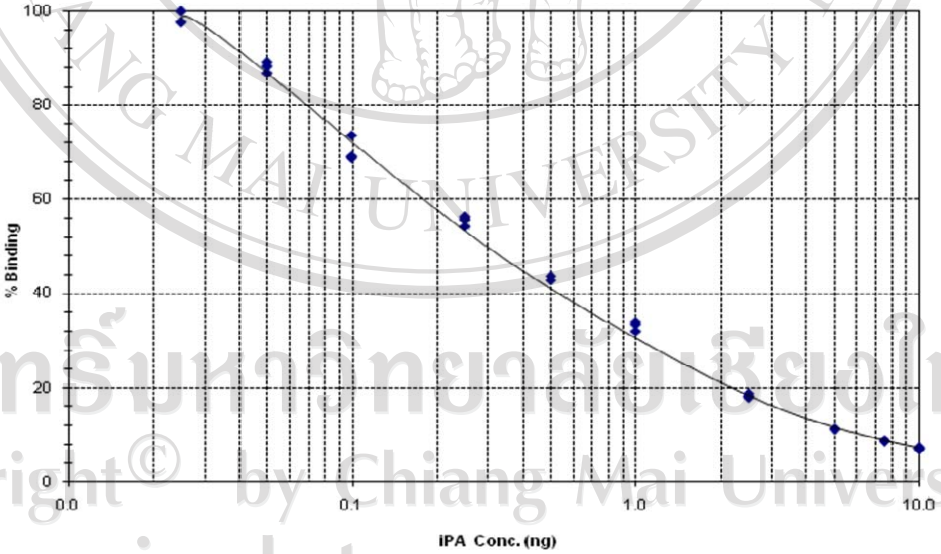
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 17 กราฟมาตรฐาน IAAโดยใช้แอนติบอดีจากซีรั่มกระต่าย

2) กราฟมาตรฐานในตรวจวัดฮอร์โมน iPA

จากกราฟมาตรฐาน iPA ที่ได้ค่า 50% binding เท่ากับ 0.2 นาโนกรัม และช่วงที่สามารถตรวจวัด iPA ได้แม่นยำอยู่ในช่วง .001-10.0 นาโนกรัม

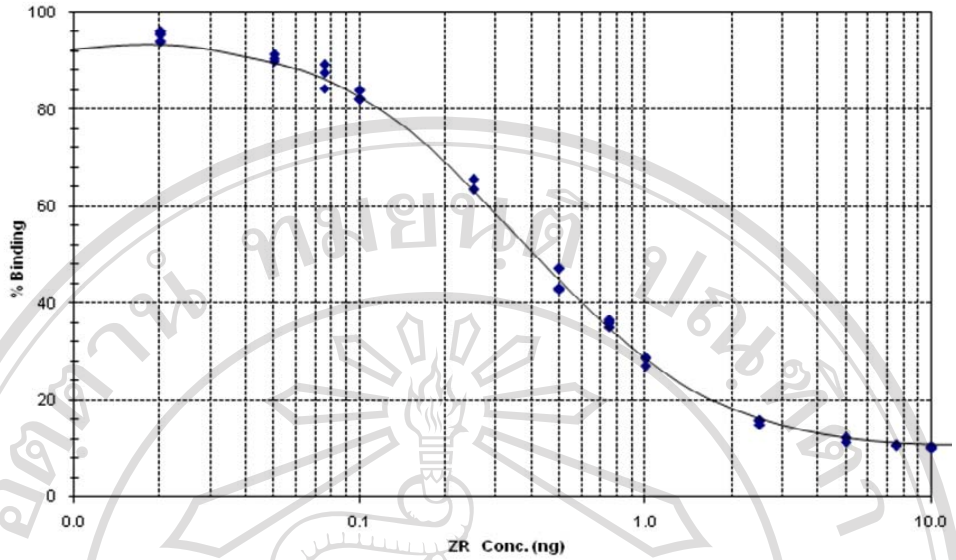


ภาพที่ 18 กราฟมาตรฐาน iPA โดยใช้แอนติบอดีจากซีรั่มกระต่าย

3) กราฟมาตรฐานในตรวจวัดฮอร์โมน Zeatin riboside (ZR)

จากกราฟมาตรฐาน ZR ที่ได้ค่า 50% binding เท่ากับ 0.45 นาโนกรัม และช่วงที่สามารถตรวจวัด ZR ได้แม่นยำอยู่ในช่วง 0.1-1.0 นาโนกรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 19 กราฟมาตรฐาน ZR โดยใช้แอนติบอดีจากซีรั่มกระต่าย

11. เก็บข้อมูลสภาพอากาศ

ในช่วงที่ทำการทดลองติดตั้งเครื่อง Datalogger รุ่น DL2e ทั้งที่ระดับความสูง 750 และ 1,200 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล (ภาพที่ 20) โดยบันทึกข้อมูลสภาพอากาศได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ แสง ลม และปริมาณน้ำฝน

(ก) **(ข)** **(ค)**

ภาพที่ 20 (ก) เครื่อง Datalogger รุ่น DL2e (ข) การติดตั้งเครื่อง Datalogger ที่ระดับความสูง 750 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล และ (ค) การติดตั้งเครื่อง Datalogger ที่ระดับความสูง 1,200 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล

ระยะเวลาในการทำการทดลอง

มิถุนายน 2550 – ธันวาคม 2551

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved