บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

พืชทดลอง

ลำไยพันธุ์ดอ (*Dimocarpus longan* cv. Daw)

สารเคมี

1. Acetic acid (Labscan®, A8401)
2. Ammonium acetate (CH_3COONH_4) (Merck®, 1.01116.1000)
3. Ammonium molybdate ($[(NH_4)]_6\ Mo_7O_{24}\ .\ 4H_2O$) (Ajax Finechem®, A46)
4. Ammonium solution 32% (Merck®, 1.05426.1000)
5. Ammonium sulfate ($[NH_4]_2SO_4$) (Ajax Finechem®, A1217)
6. Copper (II) sulfate – pentahydrate ($CuSO_4.5H_2O$) (Merck®, A501690)
7. DEAE-sephadex (Sigma®, A25120)
8. Deionized distill water 1 M T
9. D-Glucose anhydrous ($C_6H_{12}O_6$) (Ajax Finechem®, A783)
10. di - Potassium hydrogen orthophosphate (K_2HPO_4) (Ajax Finechem®, A2221)
11. di – Sodium hydrogen orthophosphate dodecahydrate ($Na_2HPO_4.12H_2O$) (Ajax Finechem®, A478)
12. Diethyl ether (Labscan®, A3509)
13. Disodium hydrogen arsenate ($Na_2HAsO_2\ .\ 7H_2O$) (Sigma, S9663)
14. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ($C_{10}H_{16}N_2O_8$) (Fluka®, 03620)
15. Hydrochloric acid 37% (HCl) (Lab-Scan®, A8601)
16. Hydrogen peroxide 30% (H_2O_2) (Merck®, 8.22287.1000)
17. Methanol (CH_3OH) (Lab-Scan®, A3513)
18. N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride solution (NED) (Merck®, 1.06237.0005)
19. Sodium hypochlorite (NaOCl) (J.T.Baker®, 9416-01)
20. Poly(vinylpolypyrrolidone) - PVP (Sigma®, P6755)
21. Potassium chlorate ($KClO_3$) (J.T.Baker®, 3024-01)
22. Potassium nitrate (KNO_3) (Merck®, 1.05063.1000)
23. Potassium phosphate (KH_2PO_4) (J.T.Baker®, 3246-01)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

24. Potassium sodium (+) – tartrate, [$KNaC_4H_4O6.4H_2O$] (Ajax Finechem®, A416)
25. Potassium sulphate (K_2SO_4) (Ajax®, 417)
26. Propan–1–OL ($CH_3CH_2CH_2OH$) (Lab-Scan®, A3543)
27. Selenium Black (Se) (Merck®, 1.07714.0050)
28. Sep-Pak-C_{18} (Sep-Pak Classic, Ireland)
29. Sodium - nitroprusside ($Na_2[Fe(CN)_5NO].2H_2O$) (J.T.Baker®, 3792-04)
30. Sodium potassium tartrate ($KNaC_4H_4O_6 . 4H_2O$) (Ajax Finechem®, A416)
31. Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) (Ajax Finechem®, 476)
32. Sodium carbonate anhydrous (Na_2CO_3) (Merck®, A836892)
33. Sodium chloride (NaCl) (Merck®, 1.06404.1000)
34. Sodium hydroxide 97% (NaOH) (Lab-Scan®, K2004)
35. Sodium nitrite ($NaNO_2$) (Ajax Finechem®, A492)
36. Sodium salicylate [$C_6H_4(OH)COONa$] (Ajax Finechem®, A1513)
37. Sodium sulfate anhydrous (Na_2SO_4) (Ajax Finechem®, A503)
38. ß-Nicotinamide Adenine Dinucleotide (ß-NADH)((Fluka®, 43410)
39. Sulfanilamide ($C_6H_8O_2N_2S$) (Carlo Erba Reagents®, 381505)
40. Sulfuric acid 98% (H_2SO_4) (Lab-Scan®, A8301)

อุปกรณ์

1. Beaker ขนาด 50, 100, 250, 1,000 และ 2,000 มิลลิลิตร
2. Cuvette แก้ว (Starna®, England)
3. Handy step (Brand®, Germany)
4. Hotplate (CE Combination®, Thailand)
5. Magnetic bar
6. Magnetic stirrer
7. Micropipette ขนาด 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (Pipettman Gilson®, Germany)
8. Para film (Parafilm® , WI 54952)
9. Pasture pipette
10. Pipette tip ขนาด 200 µl และ 1,000 µl
11. Scintillator (UltraGold®, Perkin Elmer)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

12. Speed vacuum concentrator
13. กรวยกรอง
14. กรองแก้ว filter crucible 50 ml (DURAN®,258513406, Germany)
15. กระดาษกรองเบอร์ 1 และ เบอร์ 5 (Whatman®, England)
16. กระดาษทิชชู
17. กล้องถ่ายรูปดิจิตอล (Fujifilm® E550, JAPAN)
18. โกร่งบดตัวอย่าง
19. ขวดก้นกลม (Rotary flask)
20. ขวดปรับปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร (ISO LAB®, Germany)
21. ขวดพลาสติกขนาด 60 มิลลิลิตร
22. ขวดสีชาสำหรับเก็บสารเคมี (Duran®, Germany)
23. เขียงพลาสติก
24. เครื่อง Ultrasonic bath (D.S.C. Group®, Thailand)
25. เครื่อง Vortex mixer (Scientific Industries®, USA)
26. เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo®, Switzerland)
27. เครื่องทำตัวอย่างให้แห้งโดยความเย็น (Freeze drier, FTS®)
28. เครื่องบดตัวอย่าง (Philips® HR 2021, China)
29. เครื่องพ่นยา
30. เครื่องระเหยสารภายใต้สภาพแรงดันต่ำ (Rotary evaporator, BUCHI® Rotavapor R-114, Switzerland)
31. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Shimadzu® UV-1601, JAPAN)
32. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH-meter) (Sartorius Professional Meter® PP-50, Taiwan)
33. เครื่องหมุนเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ (KUBOTA®, JAPAN)
34. ช้อนตักสาร
35. ตะแกรงวางหลอดทดลอง
36. ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส
37. ตู้อบ (Hot air oven, Memmert®, Germany)
38. เตาย่อยตัวอย่าง (MS Scientific Instrument®, Thailand)
39. ถุงกระดาษ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

40. ถุงพลาสติก
41. ถุงมือยางขนาด M (Sempermed®, Thailand)
42. โถดูดความชื้น (Desiccator)
43. ไนโตรเจนเหลว (Liquid nitrogen)
44. มีดสำหรับหั่นใบ
45. ลูกยางดูดสาร
46. หน้ากากปิดจมูก (Star®, Thailand)
47. หลอดแก้วทดลอง (Test tube) ขนาด 10 50 และ 100 มิลลิลิตร
48. หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube) ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร
49. อลูมิเนียมฟอยด์
50. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert®, Germany)

วิธีการทดลอง

1. การวางแผนการทดลอง

การทดลองที่ 1

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) จำนวน 3 กรรมวิธี มี 4 ซ้ำ โดยใช้ 1 ต้นต่อ 1 หน่วยการทดลอง ดังต่อไปนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไม่ให้โพแทสเซียมคลอเรต (กรรมวิธีควบคุม)
กรรมวิธีที่ 2 ราดโพแทสเซียมคลอเรต อัตรา 12 กรัม/ต้น
กรรมวิธีที่ 3 พ่นโพแทสเซียมคลอเรต อัตรา 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

โดยทำการราด และพ่นสารโพแทสเซียมคลอเรตแก่ต้นลำไยพันธ์ดอ อายุ 5 ปี ขนาดทรงพุ่ม 1.50 เมตร ภายในกระถางปลูกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เมตร ในวันที่ 20 ตุลาคม 2550

การทดลองที่ 2

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) จำนวน 3 กรรมวิธี มี 3 ซ้ำ โดยใช้ 1 ต้นต่อ 1 หน่วยการทดลอง ดังต่อไปนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไม่ให้โพแทสเซียมคลอเรต (กรรมวิธีควบคุม)
กรรมวิธีที่ 2 ราดโพแทสเซียมคลอเรต อัตรา 1 กรัม/ต้น
กรรมวิธีที่ 3 ปลูกในสภาพไฮโดรโปนิกส์ ที่ความเข้มข้นสารละลายโพแทสเซียม-คลอเรต 400 มิลลิกรัมต่อลิตร

โดยทำการให้สารโพแทสเซียมคลอเรตแก่ต้นลำไยพันธ์ดอ อายุ 3 ปีในวันที่ 3 ธันวาคม 2551

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การเตรียมต้นลำไย

2.1 การเลือกต้น

การทดลองที่ 1

ทำการทดลอง ที่แปลงลำไย สาขาพืชสวน ภาควิชาพืชศาสตร์ และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยใช้ต้นลำไยพันธุ์ดอ ที่มีความสมบรูณ์ที่มีอายุประมาณ อายุ 4-5 ปี ปลูกภายในบ่อซีเมนต์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 100 เซนติเมตร อยู่ในระยะใบแก่อายุใบประมาณ 40-45 วัน จำนวน 12 ต้น (ภาพที่ 1)

การทดลองที่ 2

ทำการทดลอง ที่แปลงลำไย สาขาพืชสวน ภาควิชาพืชศาสตร์ และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยเลือกต้นลำไยพันธุ์ดอ ซึ่งขยายพันธุ์ด้วยวิธีตอนกิ่ง อายุประมาณ 2 ปี ปลูกภายในกระถางพลาสติก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร

2.2 การบำรุงต้น

ใส่ ปุ๋ยคอก 500 กรัม และปุ๋ยเคมีเพื่อบำรุงต้น 200 กรัมต่อต้น โดยการเตรียมจาก

- ปุ๋ยสูตร 25-7-7 จำนวน 67 กรัม
- ปุ๋ยสูตร 46-0-0 จำนวน 67 กรัม
- ปุ๋ยสูตร 0-0-60 จำนวน 33 กรัม
- ปุ๋ยไมโครไซม์ เอ 33 กรัม

ผสมปุ๋ยเคมีทั้ง 4 ชนิดให้เข้ากันหว่า นรอบโคนต้น และให้น้ำโดยระบบมิ นิสปริงเกอร์ สัปดาห์ละ 1 ครั้ง ครั้งละ 1-2 ชั่วโมง

ภาพ 4 ต้นลำไยอายุ 5 ปีที่ใช้ในการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การให้สารโพแทสเซียมคลอเรต

3.1 การทดลองที่ 1 การราด และพ่นสารโพแทสเซียมคลอเรต

การราดสารโพแทสเซียมคลอเรตทำ โดย ราดสาร บริเวณรอบทรงพุ่ม อัตรา 12 กรัมต่อต้น จากนั้นให้น้ำตามเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

ส่วนการพ่นสาร โพแทสเซียมคลอเรตทำ โดย ละลายสาร โพแทสเซียมคลอเรต 20 กรัมในน้ำ 20 ลิตร จากนั้นจึงเติมสารจับใบ (Tween-20) จำนวน 5 หยดแล้วผสมให้เข้ากัน แล้วทำการพ่นให้ทั่วทรงพุ่มทั้งภายนอก และภายในต้น

3.2 การทดลองที่ 2 การราดสารและปลูกในสภาพไฮโดรโปนิกส์

การราดสารโพแทสเซียมคลอเรตทำโดย ราดสารบริเวณรอบโคนต้นในกระถางปลูก อัตรา 1 กรัมต่อต้น จากนั้นให้น้ำตาม

การปลูกในสภาพไฮโดรโปนิกส์ทำโดยละลายสารโพแทสเซียมคลอเรต 400 มิลลิกรัมกรัมในน้ำ แล้วจึงนำต้นลำไยไปปลูกในสภาพสารละลายตลอดช่วงการทดลอง (ภาพ 9)

4. การเก็บตัวอย่างใบ

4.1 การทดลองที่ 1

เก็บตัวอย่างใบในวันที่ 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 และ 20 หลังกรรมวิธี

4.2 การทดลองที่ 2

เก็บตัวอย่างใบในวันที่ 2, 6, 8, และ 10 หลังกรรมวิธี

5. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ในเตตรีดักเตสในใบ

5.1 การทดลองที่ 1

การเก็บตัวอย่างเริ่มเก็บในช่วงเวลา 9.00 – 11.00 น. ของทุกวันที่ทำการเก็บตัวอย่างหลังจากการให้โพแทสเซียมคลอเรตในทุกกรรมวิธี โดยเก็บตัวอย่างใบย่อยลำไยคู่ที่ 1-2 ของใบประกอบจำนวน 2 ใบมาวิเคราะห์ ตามวิธีของ Redinbaugh and Campbell (1985) โดยนำใบสดที่เก็บได้ล้างด้วยน้ำกลั่น และเช็ดใบให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู หั่นใบให้ละเอียด และนำตัวอย่างใบหนัก 0.2 กรัมใส่ในหลอดทดลองที่ประกอบด้วยสารละลายสกัด (extraction solution) 2.7 มิลลิลิตรและ PVP 0.1 กรัม เพื่อกำจัดสารประกอบฟีนอล (phenolic compound) ทำการปิดฝาหลอดทดลอง เขย่าให้ตัวอย่าง และสารละลายผสมเข้ากัน จากนั้นนำไปวางไว้ในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาบ่มจึงนำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที นาน 15 นาทีเพื่อทำให้ตัวอย่างใบและ PVP ตกตะกอน เหลือแต่ส่วนสารละลายส่วนใส (supernatant) เพื่อทำการวิเคราะห์ในขั้นตอนการพัฒนาสีต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนการพัฒนาสีนั้นจะเริ่มจากการเติมสาร 1.80 มิลลิลิตรในหลอดทดลองใหม่ จากนั้นเติม Reagent B 0.10 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองดังกล่าว เขย่าให้สารเข้ากันและนำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นดูด supernatant 0.8 มิลลิลิตรลงในหลอดที่มี Reagent A และ Reagent B ผสมอยู่ เขย่าให้สารละลายเข้ากันและแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จากนั้นหยุดการเกิดปฏิกิริยาโดยเติม Reagent D จำนวน 1 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากัน เติม Reagent E จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเพื่อพัฒนาสี และ ตั้งหลอดทดลองไว้นาน 10 นาทีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสแล้วนำสารละลายดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 540 นาโนเมตร

5.2 การทดลองที่ 2

การเก็บตัวอย่างเริ่มเก็บในช่วงเวลา 9.00 – 11.00 น. ของทุกวันที่ทำการเก็บตัวอย่างหลังจากการใช้โพแทสเซียมคลอเรตในทุกกรรมวิธี จากนั้นเลือกใบมาวิเคราะห์ โดยแบ่งใบออกเป็น 2 ส่วน คือใบส่วนบน (upper leaves) โดยเลือก 3 ข้อใบนับจากยอด และใบส่วนล่าง (lower leaves) เลือกใบตั้งแต่ข้อใบที่ 4 นับจากยอด จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเตสในใบเช่นเดียวกับข้อ 5.1

6. การวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้างจากใบ (Total Non-structural Carbohydrate; TNC)

การเก็บตัวอย่างหลังจากการใช้โพแทสเซียมคลอเรตในทุกกรรมวิธี โดยเก็บตัวอย่างใบย่อยลำไยคู่ที่ 3-4 ของใบประกอบจำนวน 4 ใบใส่ในไนโตรเจนเหลวทันที จากนั้นนำตัวอย่างมาบดและทำให้แห้งด้วยความเย็น โดยใช้เครื่อง freeze drier เป็นเวลาประมาณ 4 วัน หลังจากที่ใบลำไยแห้งดีแล้วจะต้องนำมาบดอีกครั้งให้ละเอียดด้วยเครื่องบดไปฟ้า และเก็บไว้ในถุงกระดาษแล้วเก็บรักษาในโถดูดความชื้น (desiccator) เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป ตามวิธีของ Hodge and Hofreiter (1962) ที่ดัดแปลงโดย สุจริต (2531)

การสกัด TNC จากตัวอย่างพืชจะใช้สารละลายกรดเจือจาง (0.2N H_2SO_4) ตามวิธีการของ *Smith* et al. (1964) โดยนำตัวอย่างพืชที่บดละเอียด และปราศจากความชื้นไปชั่งน้ำหนัก 0.200 กรัม แล้วใส่ลงไปในหลอดทดลองชนิดแก้ว ขนาด 60 มิลลิลิตร เติม กรดซัลฟิวริค 0.2N ลงไป 40 มิลลิลิตร แล้วนำกระดาษอลูมิเนียมปิดปากหลอดทดลอง ก่อน นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้น นำตัวอย่างมาแช่ในน้ำเพื่อลดอุณหภูมิ แล้วปรับ pH ให้เป็นกลาง (pH = 7.0) ด้วย NaOH ความเข้มข้น 1M และ 0.1M หรือ H_2SO_4 ความเข้มข้น 0.2N จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นในกรวยปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรองเบอร์ 1 เก็บสารละลายที่ได้ไว้ในขวดพลาสติกขนาด 60 มิลลิลิตร และนำไปแช่ตู้เย็นเพื่อรอวิเคราะห์ต่อไป

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 เติมน้ำกลั่น ในแต่ละหลอดจนมีปริมาตรเป็น 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

วิธีการวิเคราะห์

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

2. การวิเคราะห์ปริมาณ TNC ในตัวอย่าง

นำสารละลายที่สกัดได้จากตัวอย่างใส่หลอดทดสอบ 1 มิลลิลิตร ทำเช่นเดียวกับการเตรียมกราฟมาตรฐาน นำค่า การดูดกลืนคลื่นแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ทำไว้แล้วคำนวณปริมาตรเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ D-glucose ต่อน้ำแห้งของตัวอย่าง

3. วิธีคำนวณ

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

vol make = ปริมาตรสุดท้ายหลังจากปรับ pH ให้เป็นกลาง (50 ml)

vol take = ปริมาตรของสารละลายที่ใช้ทดสอบค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (1 ml)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7. การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธีการพัฒนาสี

การเก็บตัวอย่างหลังจากการใช้โพแทสเซียมคลอเรตในทุกกรรมวิธี โดยเก็บตัวอย่างใบย่อยลำไยคู่ที่ 3-4 ของใบประกอบจำนวน 4 ใบใส่ในไนโตรเจนเหลวทันที จากนั้นนำตัวอย่างมาบดและทำให้แห้งด้วยความเย็น โดยใช้เครื่อง freeze drier เป็นเวลาประมาณ 4 วัน หลังจากที่ใบลำไยแห้งดีแล้วจะต้องนำมาบดอีกครั้งให้ละเอียดด้วย เครื่องบดไปฟ้า และเก็บไว้ในถุงกระดาษแล้วเก็บรักษาในโถดูดความชื้น (desiccator) เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป โดยวิธี Novozamsky *et al.* (1983)

วิธีการ

1. การย่อยตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างพืช 0.200 กรัม ใส่หลอด แก้วย่อยตัวอย่าง และเติม สารละลายสำหรับย่อยตัวอย่างใบลำไย จำนวน 3 มล. เขย่าให้ตัวอย่างใบ และสารละลายเข้ากันด้วยความระมัดระวัง แล้วตั้งทิ้งเป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง (ทำ blank 2 หลอด) จากนั้นนำไปใส่ในหลุมเตาย่อยตัวอย่าง แล้วปรับอุณหภูมิเริ่มต้นเป็น 100 °C นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำเอาหลอดออกมาตั้งไว้ให้เย็นภายนอกเตาย่อย แล้วจึงเติม Hydrogen peroxide 30% ครั้งละ 1 มล. เป็นจำนวน 3 ครั้ง โดยทำการผสมด้วยความระมัดระวังในแต่ละครั้ง และควรรอให้การทำปฏิกิริยาของ Hydrogen peroxide 30% ลดลง (ประมาณ 10 วินาที) ก่อนที่จะเติมครั้งต่อไป จากนั้นจึงนำหลอดแก้วกลับไปไว้ในหลุม เตาย่อยตัวอย่าง แล้วจึงปรับอุณหภูมิตามตารางที่ 1 จนกระทั่งการย่อยเสร็จสมบูรณ์ จะได้สารละลายใส

ตาราง 1 การปรับอุณหภูมิเตาย่อยตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจน

อุณหภูมิ (°C)	ระยะเวลา
170	2 ชั่วโมง
220	1 ชั่วโมง
270	1 ชั่วโมง
320	1 ชั่วโมง
370	1 ชั่วโมงหรือเมื่อเปลี่ยนเป็นสารละลายใส

ตั้งทิ้งให้เย็นแล้วจึงปรับปริมาตรของสารละลายเป็น 50 มล. ด้วยน้ำกลั่น กรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 5 แล้วเก็บไว้ขวดพลาสติกขนาด 60 มล. เพื่อรอทำการวิเคราะห์ต่อไป (ควรเก็บตัวอย่างในตู้เย็นถ้าหากยังไม่วิเคราะห์ทันที)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่าง

- ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1 มล. ใส่หลอดทดลองขนาด 20 มล.
- เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 5.0 มล. แล้วเขย่าให้สารละลายผสมกัน
- เติมสารละลายผสม Na-salicylate และ Na-Nitroprusside จำนวน 4.0 มล. แล้วเขย่าให้สารละลายผสมกัน
- เติมสารละลาย Na-Hypochlorite 2.0 มล. เขย่าผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 45-60 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ 650 นาโนเมตร

8. การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนในใบ

8.1 . การเก็บตัวอย่างพืช (Sample collection)

เก็บตัวอย่างหลังจากการใช้โพแทสเซียมคลอเรต ในทุกกรรมวิธี ในวันที่ 0 , 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 และ 20 โดยเก็บตัวอย่างใบย่อยลำไยคู่ที่ 1-2 ของใบประกอบจำนวน 2 ใบใส่ในไนโตรเจนเหลวทันที จากนั้นนำตัวอย่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน โดยวิธี RIA

เก็บตัวอย่างพืชที่ต้องการศึกษา ใส่ลงในไนโตรเจนเหลวทันที จากนั้น นำตัวอย่างเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยความเย็นภายใต้สภาพสุญญากาศ ด้วยเครื่อง Freeze dry เพื่อรอการสกัด

8.2 การสกัดตัวอย่างพืช (plant sample extraction)

1. นำตัวอย่างพืชที่เก็บไว้ไปทำให้แห้งด้วยความเย็นภายใต้สภาพสุญญากาศ ด้วยเครื่อง freeze dryer ชั่งน้ำหนักตัวอย่างพืช และบดตัวอย่างพืชให้ละเอียดด้วยโกร่ง โดยเติมไนโตรเจนเหลวขณะทำการบด เพื่อรักษาสภาพความเย็น
2. เติมเมธานอลเย็น (เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส) ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 50 มิลลิลิตร

ภาพ 5 การบดและการสกัดตัวอย่างพืช

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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

ภาพ 6 การกรองและการระเหยแห้งสารสกัดตัวอย่างพืช

6. นำสารสกัดตัวอย่างที่ -20 °C มาละลายให้เป็นของเหลว แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,500 รอบต่อนาทีนาน 25 นาที ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเทส่วนใส (supernatant) ลงในขวดแก้ว ขนาด 30 มิลลิลิตร
7. นำสารสกัด เทผ่านคอลัมน์และ Sep-Pak-C_{18} ซึ่งเป็นการทำสารสกัดพืชให้บริสุทธิ์ (Jiménez *et al.*, 2001) โดยวิธีการเตรียมดังต่อไปนี้

8.3 การเตรียมคอลัมน์

คอลัมน์ประกอบด้วย 3 ส่วนคือ

1) หลอดบรรจุสารละลาย (reservoir)

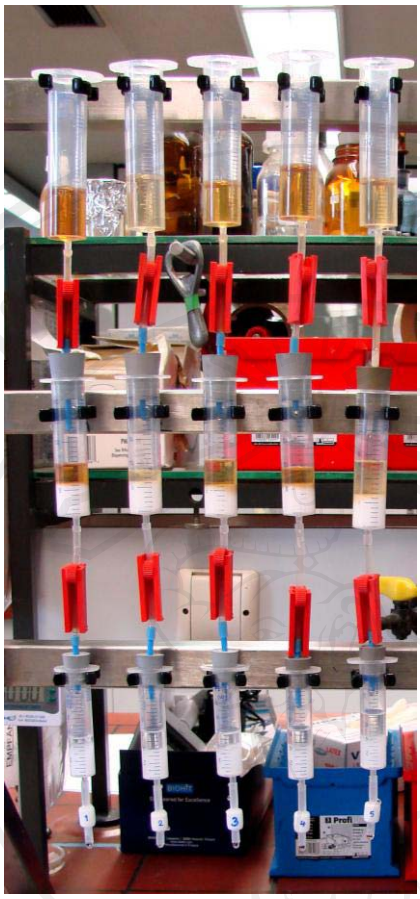
2) หลอดบรรจุ PVP (Polyvinylpyrrolidone)

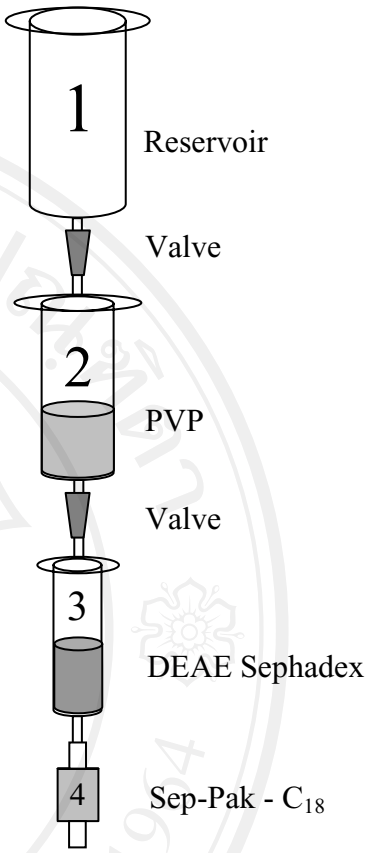
3) หลอดบรรจุ DEAE-sephadex (anion exchange)

4) Sep-Pak-C_{18}

โดยระหว่างหลอดจะมีวาล์วบังคับการไหลของสารละลาย (การเตรียมสารดังภาคผนวก) (ภาพ 7)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved





ภาพ 7 ส่วนประกอบของคอลัมน์ในการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืช

เริ่มต้นโดยเติม PVP 10 มิลลิลิตร ในหลอดที่ 2 และเติม DEAE-sephadex 4 มิลลิลิตร ในหลอดที่ 3 ทิ้งไว้ 30 นาที นำหลอดที่ 1 , 2 และ 3 มาต่อกัน 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)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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 และ GAs

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

1.1. การทำให้บริสุทธิ์ของสารละลายตัวอย่าง

1.1.1. นำ cytokinin Sep-Pak-C_{18} ที่เตรียมไว้ ต่อเข้าที่ปลายคอลัมน์ นำสารสกัดที่ได้มาเติมลงในหลอดที่ 1 (reservoir) เปิดวาล์วให้สารสกัดไหลลงผ่านคอลัมน์จนหมด แล้ว ล้างขวดสารสกัดตัวอย่างซ้ำอีก 3 ครั้ง ด้วย 0.01 M ammonium acetate pH 7.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผ่านลงในคอลัมน์ปล่อยสารละลายไหลผ่านจนหมด เมื่อถึงขั้นตอนนี้ ฮอร์โมน IAA จะถูกจับอยู่ที่ DEAE-sephadex ส่วน cytokinin จะถูกจับอยู่ใน Sep-Pak-C_{18}

1.1.2. ถอด cytokinin Sep-Pak-C_{18} ออกจากคอลัมน์ ปิดปลายคอลัมน์หลอดที่ 3 ด้วย septum ถอดเอาหลอดที่ 2 (PVP) ออกไป จัดคอลัมน์ใหม่เหลือเฉพาะ หลอดที่ 1 (reservoir) และหลอดที่ 3 (DEAE-sephadex) ต่อกัน นำ 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

1.1.3. การชะฮอร์โมนออกจาก Sep-Pak-C_{18}

การชะฮอร์โมนแต่ละชนิดออกจาก Sep-Pak-C_{18}ทำโดย

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

Z/ZR	30 % methanol in 0.1 M acetic acid ปริมาณ 4 มิลลิลิตร
GAs	60 % methanol in 0.1 M acetic acid ปริมาณ 4 มิลลิลิตร
iP/iPA	80 % methanol in 0.1 M acetic acid ปริมาณ 4 มิลลิลิตร
IAA	40 % methanol in 0.1 M acetic acid ปริมาณ 4 มิลลิลิตร

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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

การวิเคราะห์ปริมาณ (Determination)

1. Radioimmunoassay (RIA)

เทคนิค RIA เป็นเทคนิคทาง immunoassay ที่นิยมใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารที่มีปริมาณน้อยๆ ซึ่งต้องการความไว (Sensitivity) สูง มีความจำเพาะเจาะจง (Specificity) สูง ความสำเร็จหรือปัจจัยหลักในการพัฒนาเทคนิค RIA ในการตรวจวัดฮอร์โมนพืชแต่ละชนิด ขึ้นกับความสามารถในการผลิตแอนติเจนและแอนติบอดีของฮอร์โมนแต่ละชนิด (Weiler and Ziegler, 1984) ความจำเพาะจงกับฮอร์โมนจะขึ้นอยู่กับการเลือกใช้ชนิดของแอนติบอดี เช่น โพลีโคลนอลแอนติบอดี (Polyclonal antibody) จากซีรั่มของกระต่าย หรือโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody) ที่ผลิตจากไฮบริโดมาเซลล์ (Hybridoma cell)

1.1. สารเคมีที่ต้องเตรียม

a. Phosphate buffer 250 ไมโครลิตรต่อหลอด

- KH_2PO_4 0.46 กรัม
- K_2HPO_4 1.36 กรัม
- NaCl 10.4 กรัม
- ละลายในน้ำ 1.2 ลิตร
- ปรับ pH = 7.4

b. เซรุ่มลูกวัว (calf serum) 50 ไมโครลิตรต่อหลอด

- นำมาใช้เพื่อให้โปนตีนและแอนติเจนตกตะกอน
- เจือจางเซรุ่ม 1:10 (สารละลายบัฟเฟอร์ 450 มล. + เซรุ่ม 50 มล.)

c. ^{3}H-Hormone (tracer) 50 ไมโครลิตรต่อหลอด (1.5 MBq.; 25000 dpm)

d. แอนติบอดี (antibody) 50 ไมโครลิตรต่อหลอด

e. แอมโมเนียมฟอสเฟต 750 ไมโครลิตรต่อหลอด

การเตรียมสาร : ชั่งแอมโมเนียมฟอสเฟต 790 กรัมในน้ำ 1 ลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2 ตัวอย่าง

- เตรียมหลอดแก้วขนาดความยาว 60 มิลลิลิตร เรียงลงใน rack นำสารตัวอย่าง (จากข้อ 3.4) มา aliquot ลงในหลอดแก้ว ปริมาตร 100-500 µl (ขึ้นอยู่กับฮอร์โมนแต่ละชนิด) โดยทำ 3 ซ้ำ (triplicate) ในแต่ละปริมาตร นำหลอดตัวอย่างไประเหยแห้งในเครื่อง speed vacuum concentrator
- สำหรับฮอร์โมน IAA ต้องนำมาทำ methylation โดยเติม ethereal diazometane 50 µl ปิดฝาหลอด บ่มในที่มืด 30 นาที จากนั้นเปิดฝาให้ ethereal diazometane ระเหยแห้ง (ต้องทำในตู้ดูดควันเท่านั้น)

1.3 Dispensing

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

Bo: maximum bound activity

Bx: bound activity in presence of sample

NSB: non specific binding

T: สารกัมมันตภาพรังสีทั้งหมดที่เติมลงไป

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.4 Assay

- เติม phosphate buffer ลงในหลอดแก้วทั้งหมดที่วางเรียงใน rack และเขย่าที่ 1,200 rpm
- เติม serum, ^{3}H-Hormone และ antibody ตามตารางข้อ 3 เขย่าที่ 1200 rpm บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ในระหว่างบ่ม เขย่าที่ 1 ,200 rpm อีก 1 ครั้ง (หลังจากครั้งแรก 15 นาที)
- เติม ammonium sulphate 90% ปริมาตร 750 µl เขย่า ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้โปรตีนตกตะกอน
- นำหลอดแก้วไปหมุนเหวี่ยงที่ 4,000 rpm นาน 40 นาที
- เทส่วน supernatant ทิ้งลงในภาชนะจัดเก็บสารกัมมันตรังสี ซับปากหลอดแก้วโดยคว่ำ rack ลงบนกระดาษชำระ
- เติม ammonium sulphate 50% ปริมาตร 750 µl นำหลอดแก้วไปหมุนเหวี่ยงที่ 4000 rpm 30 นาที
- เทส่วน supernatant ทิ้งลงในภาชนะจัดเก็บสารกัมมันตรังสี ซับปากหลอดแก้วโดยคว่ำ rack ลงบนกระดาษชำระ
- เติมน้ำกลั่น 200 µl แล้วเขย่า
- เติม scintillator (UltraGold, Perkin Elmer) ปิดฝาหลอดแก้วให้แน่น ด้วย plastic stoppers
- เขย่าให้สารละลายผสมกัน นำไปวัดค่ากัมมันตรังสี
- คำนวณค่าจากกราฟมาตรฐานของฮอร์โมนแต่ละชนิด

2.5 การบันทึกผลทางกายภาพ บันทึกระยะเวลาการออกดอกหลังการได้รับสารโพแทสเซียมคลอเรต

2.6 หาความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ

สถานที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. ห้องปฏิบัติการสาขาวิชาพืชสวน ภาควิชาพืชศาสตร์ และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2. ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาการดำเนินการวิจัย

เดือนพฤษภาคม 2550 - ธันวาคม 2551

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved