บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของการสร้างตาดอก

การศึกษาในส่วนนี้เป็นการนำเนื้อเยื่อปลายยอดของ *Ornithogalum arabicum L.* มาทำการศึกษาโดยวิธีการ paraffin embedding method โดยใช้เทคนิคของ Johansen (1940) และ Sass (1966)

1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.1.1 พืชทดลอง คือ หัวพันธุ์ *Ornithogalum arabicum L.* ได้จากสถานีวิจัยโครงการหลวงดอยอินทนนท์ อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่

1.1.2 ขวดแก้วสำหรับใส่น้ำยาเคมีและเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อพืช

1.1.3 ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ระดับ 56 องศาเซลเซียส

1.1.4 แท่งไม้ขนาด 1.5 × 1.5 × 1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มให้อิ่มตัวในพาราฟิน

1.1.5 เครื่องตัดเนื้อเยื่อพืชแบบล้อหมุน (rotary microtome)

1.1.6 แผ่นสไลด์และแผ่นปิดสไลด์

1.1.7 เข็มเขี่ย

1.1.8 ปากคีบ

1.1.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.1.10 มีดผ่าตัด

1.1.11 พู่กัน

1.1.12 ขวดแก้วสำหรับย้อมสีเนื้อเยื่อ

1.1.13 เครื่องให้ความร้อนสำหรับอุ่นแผ่นสไลด์ (hot plate)

1.1.14 กล้องจุลทรรศน์

1.1.15 กล้องถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ และฟิล์ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 1 ออนิโธกาลัมชนิด *arabicum*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมชิ้นส่วนพืชและสไลด์ถาวร

1.2.1 น้ำยาสำหรับฆ่าและรักษาสภาพเซลล์ (killing and fixing solution) คือ น้ำยา FAA (formalin-acetic acid-alcohol) ประกอบด้วยสารเคมีในอัตราส่วนดังต่อไปนี้

ethyl alcohol 95%	50	มิลลิลิตร
glacial acetic acid	5	มิลลิลิตร
formalin	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	35	มิลลิลิตร

1.2.2 น้ำยาสำหรับการดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution) ประกอบด้วย ethyl alcohol 95% , absolute alcohol , tertiary butyl alcohol (TBA) และน้ำกลั่น โดยผสมไว้เป็นอัตราส่วน 4 ระดับ ตามวิธีของ Sass (1966) ซึ่งมีส่วนผสมและอัตราส่วนของสารเคมีดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 อัตราส่วนของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้สำหรับดึงน้ำออกจากเซลล์

อัตราส่วนของส่วนผสม (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้น (%)				
	50	70	85	95	100
น้ำกลั่น	50	30	15	-	-
ethyl alcohol 95%	40	50	50	45	-
TBA	10	20	35	55	75*
absolute ethyl alcohol	-	-	-	-	25

* ผสมสี erythrosin

1.2.3 สารตัวกลางที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อ (embedding media) ได้แก่ พาราฟิน

1.2.4 น้ำยายึดเนื้อเยื่อให้ติดบนแผ่นสไลด์ (adhesive)

ใช้อัลบูมิน ซึ่งสามารถเตรียม โดยมีส่วนผสมดังนี้

ไข่ขาว	1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	49	มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อนำไปใช้ ให้ผสมน้ำยา โดยนำสารละลายเข้มข้นที่เตรียมไว้มา 1 มิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร

1.2.5 น้ำยาทำให้เนื้อเยื่อใสสะอาด (clearing reagent) คือ xylene

1.2.6 สีสังเคราะห์สำหรับย้อมเนื้อเยื่อ คือ Dalafield's hematoxylin ซึ่งมีส่วนผสมดังนี้ (Johansen, 1940)

ammonium aluminium sulfate	400	มิลลิลิตร
hematoxylin	4	กรัม
95% ethyl alcohol	25	มิลลิลิตร
methyl alcohol	100	มิลลิลิตร
glycerol	100	มิลลิลิตร

1.2.7 สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นสไลด์ ได้แก่ Canada balsam

1.3 วิธีการทดลอง

สุ่มเก็บตัวอย่างหัวพันธุ์ *Ornithogalum arabicum L.* ตั้งแต่เริ่มปลูก ทุก 2 สัปดาห์ มาทำการแกะกาบใบ (scale) ที่ประกอบขึ้นเป็นหัวออกทีละชั้น จนถึงส่วนกลางของหัว ตัดชิ้นส่วนปลายยอดของพืชเป็นชิ้นเล็กแล้วนำไปศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาโดยใช้วิธี paraffin embedding method โดยใช้วิธีของ Johansen (1940) และ Sass (1966) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1.3.1 นำชิ้นส่วนพืชแช่ในน้ำยา FAA ซึ่งทำหน้าที่หยุดการทำงานของเซลล์และรักษาสภาพเซลล์ โดยแช่ให้น้ำยาท่วมชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืช ทิ้งเนื้อเยื่อไว้ในน้ำยาอย่างน้อย 1 สัปดาห์

1.3.2 ทำการดึงน้ำออกจากเซลล์ของเนื้อเยื่อ โดยผ่านเนื้อเยื่อที่ทำการตรึงและรักษาสภาพเซลล์แล้วนั้นลงในน้ำยาที่ใช้ในการดึงน้ำออกจากเซลล์ จากน้ำยาระดับแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นต่ำ คือ 50 เปอร์เซ็นต์ แล้วเพิ่มความเข้มข้นเป็น 70, 85, 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยแต่ละระดับใช้ระยะเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง

1.3.3 ทำการแทรกพาราฟินเข้าไปในเนื้อเยื่อพืช โดยใช้ส่วนผสมของ TBA ผสมกับพาราฟินเหลว อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง เพื่อให้พาราฟินซึมผ่านเนื้อเยื่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3.4 นำเนื้อเยื่อแช่ลงในพาราฟิน ซึ่งหลอมไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส และทิ้งเนื้อเยื่อไว้ในขวดที่บรรจุพาราฟินดังกล่าวไว้ในตู้อบอย่างน้อย 1 สัปดาห์

1.3.5 การฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน ในขณะที่ฝังเนื้อเยื่อใช้เข็มเขี่ยหรือใบมีดลนไฟให้ร้อนไล่ฟองอากาศที่อยู่ในพาราฟินออกให้หมดพร้อมทั้งจัดเรียงเนื้อเยื่อพืชให้อยู่ในระนาบและตำแหน่งที่ต้องการตัด ทิ้งให้เย็นตัวจากนั้นนำมาตัดเป็นแท่งสี่เหลี่ยมตามลักษณะของเนื้อเยื่อ

1.3.6 นำชิ้นส่วนพืชที่ฝังในพาราฟินแล้วมาติดบนแท่งไม้ แล้วนำเนื้อเยื่อไปตัด โดยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุน (rotary microtome) ตัดให้มีความหนา 10-15 ไมครอน เมื่อได้แถบชิ้นส่วนพืชมาแล้วเลือกส่วนที่สมบูรณ์ที่สุด โดยดูใต้กล้องจุลทรรศน์

1.3.7 นำแผ่นริบบอนเนื้อเยื่อที่ได้ติดบนแผ่นสไลด์โดยหยดน้ำยา adhesive ลงบนแผ่นสไลด์ ใช้พู่กันเกลี่ยและวางแถบเนื้อเยื่อลงไป นำแผ่นสไลด์ไปวางบนแผ่นให้ความร้อนสำหรับอุ่นแผ่นสไลด์เป็นเวลา 2 - 3 วัน เพื่อให้แถบชิ้นส่วนแห้งและติดแน่นบนแผ่นสไลด์ก่อนทำการย้อมสี

1.3.8 ย้อมสีเนื้อเยื่อด้วยสี Delafield's hematoxylin ขั้นตอนการย้อมสีใช้เวลาย้อมในแต่ละขั้นตอน 3 - 5 นาที โดยผ่านแผ่นสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อพืชติดอยู่ผ่านน้ำยาต่าง ๆ ตามลำดับขั้นตอน ดังนี้

1.3.8.1 xylene
1.3.8.2 xylene + ethyl alcohol 100% ในอัตราส่วน 1:1
1.3.8.3 ethyl alcohol 100%
1.3.8.4 ethyl alcohol 95%
1.3.8.5 ethyl alcohol 70%
1.3.8.6 ethyl alcohol 50%
1.3.8.7 ethyl alcohol 30%
1.3.8.8 สี hematoxylin
1.3.8.9 น้ำประปา
1.3.8.10 ethyl alcohol 30%
1.3.8.11 ethyl alcohol 50%
1.3.8.12 ethyl alcohol 70%
1.3.8.13 ethyl alcohol 95%
1.3.8.14 ethyl alcohol 100%
1.3.8.15 ethyl alcohol 100% + xylene ในอัตราส่วน 1:1
1.3.8.16 ethyl alcohol 100%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3.9 ปิดแผ่นสไลด์ด้วยแผ่นปิดสไลด์หลังจากสีย้อมแห้งแล้วโดยใช้ Canada balsam เป็นสารยึดสไลด์ถาวร

1.3.10นำแผ่นสไลด์ที่ได้ไปศึกษาและถ่ายรูปใต้กล้องจุลทรรศน์

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของความเข้มแสงต่อการเจริญเติบโตของออนิโธกาลัม

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

1. หัวพันธุ์ของออนิโธกาลัม เกรด C (เส้นผ่านศูนย์กลาง 2 – 3 เซนติเมตร, น้ำหนักสด 10 กรัม) จำนวน 32 หัว
2. วัสดุปลูก ได้แก่ ดิน : ทราย : เปลือกข้าว อัตราส่วน 1: 1 : 1
3. กระถางดำขนาด 6 นิ้ว
4. ไม้บรรทัดยาว
5. ป้ายสำหรับเขียนชื่อ
6. โรงเรือนที่คลุมด้วยตาข่ายเพื่อลดความเข้มแสงลง 4 ระดับ (กรรมวิธีควบคุม)ได้แก่
    1. โรงเรือนไม่พรางแสงตั้งอยู่กลางแจ้ง
    2. โรงเรือนพรางแสงด้วยตาข่ายขนาด 50% 1 ชั้น
    3. โรงเรือนพรางแสงด้วยตาข่ายขนาด 75% 1 ชั้น
    4. โรงเรือนพรางแสงด้วยตาข่ายขนาด 50% 2 ชั้น

2.2 วิธีการทดลอง

นำหัวพันธุ์ *Ornithogalum arabicum L.* มาปลูกลงในกระถาง กระถางละ 1 หัว วัสดุปลูกที่ใช้ คือ ดิน : ทราย : เปลือกข้าว อัตราส่วน 1 : 1 : 1 นำพืชที่เตรียมได้มาปลูกในโรงเรือนที่มีสภาพการพรางแสงที่ระดับต่างกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) แบ่งการทดลองเป็น 4 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 8 ซ้ำ (กระถาง) คือ

กรรมวิธีที่ 1 ปลูกภายใต้สภาพที่ไม่มีการพรางแสง

กรรมวิธีที่ 2 ปลูกภายใต้สภาพการพรางแสง 50%

กรรมวิธีที่ 3 ปลูกภายใต้สภาพการพรางแสง 75%
กรรมวิธีที่ 4 ปลูกภายใต้สภาพการพรางแสง 100%

บันทึกข้อมูลเกี่ยวกับการเจริญเติบโต ดังนี้

2.2.1 การเจริญเติบโตทางใบ ได้แก่ ความสูง (เซนติเมตร) (วัดจากโคนใบจนถึงปลายใบที่สูงที่สุด) และจำนวนใบต่อกอ

2.2.2 การเจริญเติบโตทางดอก ได้แก่ ระยะเวลาในการออกดอก (จำนวนวันที่ใช้ตั้งแต่เริ่มปลูกจนดอกบาน) ปริมาณและคุณภาพของดอก

วิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS ตรวจสอบค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least Significant Difference ที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$

การทดลองที่ 3 ผลของขนาดหัวต่อการเจริญเติบโตและการออกดอกของออนิโธกาลัม

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 หัวพันธุ์ของออนิโธกาลัม
3.1.2 วัสดุปลูก ได้แก่ ด้วย ดิน : ทราย : เปลือกข้าว อัตราส่วน 1:1:1
3.1.3 แปลงขนาด 1 × 1 เมตร จำนวน 18 แปลง
3.1.4 ไม้บรรทัดยาว ปากกา
3.1.5 ป้ายสำหรับเขียนชื่อ

3.2 วิธีการทดลอง

ปลูกหัวพันธุ์ของออนิโธกาลัมลงในแปลงซึ่งอยู่ในโรงเรือนพลาสติก โดยเว้นหัวแปลงและท้ายแปลง 10 เซนติเมตร ใช้วัสดุปลูกที่ประกอบด้วย ดิน : ทราย : เปลือกข้าว อัตราส่วน 1:1:1 ระยะปลูกระหว่างแถวห่างกัน 15 × 15 เซนติเมตร ระดับความลึกของหัวที่ปลูกประมาณ 3 เซนติเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วางแผนการทดลองแบบบล็อคสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design, RCBD) โดยปลูกกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ (แปลง) แปลงละ 25 หัว สุ่มเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตของแต่ละกรรมวิธี 10 หัวในแต่ละแปลง ศึกษาขนาดหัวต่างกันจำนวน 6 กรรมวิธี (ขนาด) ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 หัวพันธุ์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง มากกว่า 5 เซนติเมตร น้ำหนักสดเฉลี่ย 70 กรัม

กรรมวิธีที่ 2 หัวพันธุ์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 – 5 เซนติเมตร น้ำหนักสดเฉลี่ย 50 กรัม

กรรมวิธีที่ 3 หัวพันธุ์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 – 4 เซนติเมตร น้ำหนักสดเฉลี่ย 25 กรัม

กรรมวิธีที่ 4 หัวพันธุ์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 – 3 เซนติเมตร น้ำหนักสดเฉลี่ย 10 กรัม

กรรมวิธีที่ 5 หัวพันธุ์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 – 2 เซนติเมตร น้ำหนักสดเฉลี่ย 5 กรัม

กรรมวิธีที่ 6 หัวเล็ก(bulblet) เส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 1 เซนติเมตร น้ำหนักสดน้อยกว่า 5 กรัม

การบันทึกผลการทดลอง

1. การเจริญเติบโตทางใบ
   - ความสูงของต้น (ความยาวใบตั้งแต่โคนจนถึงปลายใบ)
   - จำนวนใบต่อต้น
2. การเจริญเติบโตทางดอกและคุณภาพดอก
   - ระยะเวลาในการออกดอก (ระยะเวลาตั้งแต่เริ่มปลูกจนถึงดอกบาน)
   - จำนวนช่อดอกต่อต้น
   - จำนวนดอกย่อยต่อช่อ
   - ความยาวก้านช่อดอก

วิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS ตรวจสอบค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least Significant Difference ที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 2 หัวออนิโธกาลัมที่ใช้ในการศึกษา

J = เส้นผ่านศูนย์กลาง มากกว่า 5 เซนติเมตร

A = เส้นผ่านศูนย์กลาง 4 – 5 เซนติเมตร

B = เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 – 4 เซนติเมตร

C = เส้นผ่านศูนย์กลาง 2 – 3 เซนติเมตร

D = เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 – 2 เซนติเมตร

Bulblet = เส้นผ่านศูนย์กลาง น้อยกว่า 1 เซนติเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ก.

ข.

ภาพที่ 3 สภาพแปลงที่ปลูกออนิโธกาลัม

ก. การเจริญเติบโตหลังปลูก 4 สัปดาห์

ข. การเจริญเติบโตหลังปลูก 12 สัปดาห์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 4 การศึกษาผลของขนาดหัวต่อการสะสมน้ำตาลและแป้ง

4.1 วัสดุและอุปกรณ์

4.1.1 หัวพันธุ์ออนิโธกาลัม ซึ่งมีขนาดหัวแตกต่างกัน 3 ขนาด คือ
- ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง มากกว่า 5 เซนติเมตร
- ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 - 5 เซนติเมตร
- ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 – 4 เซนติเมตร

4.1.2 โกร่งบด (porcelain)
4.1.3 หลอดทดลอง (test tubes)
4.1.4 บีกเกอร์ (beaker)
4.1.5 กระบอกตวง (cylinder)
4.1.6 หลอดสำหรับ centrifuge ขนาด 50 มล
4.1.7 ปิเปต และ ไมโครปิเปต
4.1.8 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
4.1.9 ขวดชมพู่ (erlenmyer flasks)
4.1.10 กรวยกรอง
4.1.11 ขาตั้งหลอดทดลอง
4.1.12 waterbath
4.1.13 เครื่องปั่น (vortex)
4.1.14 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
4.1.15 เครื่อง spectrophotometer
4.1.16 แท่งแก้วคน
4.1.17 กระดาษกรอง เบอร์ 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

- สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์หาความเข้มข้นของน้ำตาล

1. absolute ethanol
2. ethanol 80%
3. D-glucose, anhydrous ($C_6H_{12}O_6$ = 180.16)
4. phenol 5% (W/v)
5. กรดซัลฟูริกเข้มข้น

- สารเคมีที่ใช้สำหรับวิเคราะห์หาความเข้มข้นของแป้ง

1. น้ำกลั่น
2. D-glucose, anhydrous
3. anthone
4. กรดซัลฟูริกเข้มข้น
5. กรดเปอร์คลอริก 8.14 N ($HClO_4$)

4.3 วิธีการทดลอง

ศึกษาการใช้แป้งและน้ำตาลในออนิโธกาลัมที่ระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ 4 ระยะ

ในการทดลองมีทั้งหมด 3 กรรมวิธี คือ หัวพันธุ์ *Ornithogalum arabicum L.* ที่มีขนาดหัวแตกต่างกัน 3 ขนาด ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 หัวพันธุ์เกรด J เส้นผ่านศูนย์กลาง มากกว่า 5 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 2 หัวพันธุ์เกรด A เส้นผ่านศูนย์กลาง 4 – 5 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 3 หัวพันธุ์เกรด B เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 – 4 เซนติเมตร

นำมาปลูกลงในแปลง เก็บหัวพันธุ์ในระยะการเจริญเติบโตต่างกัน 4 ระยะ จำนวน 4 ซ้ำต่อกรรมวิธี

ระยะที่ 1 หัวพันธุ์เริ่มต้นที่ใช้ปลูก

ระยะที่ 2 ต้นที่กำลังเจริญเติบโตทางใบ

ระยะที่ 3 ต้นที่อยู่ในช่วงออกดอก

ระยะที่ 4 ต้นที่เข้าสู่ระยะพักตัว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำพืชที่สุ่มได้มาแยกส่วนต่างๆ คือ หัว ใบ ราก ช่อดอก ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา และล้างด้วยน้ำกลั่นจำนวน 2 ครั้ง ก่อนนำมาวิเคราะห์สารต่าง ๆ ตามวิธีการดังนี้

4.3.1 การสกัดพืชเพื่อวิเคราะห์น้ำตาล (Dubois *et al.*,1956)

1. เตรียมโกร่งบดตัวอย่างพืช และเตรียม 80% ethanol
2. ชั่งน้ำหนักสดของตัวอย่างพืช 2 กรัม มาทำการสกัดด้วย absolute ethanol 2 มิลลิลิตร บดพืชให้ละเอียดในโกร่ง
3. จากนั้นเทใส่หลอดเซนติฟิวส์ขนาด 50 มิลลิลิตร ล้างตะกอนด้วย absolute ethanol ที่เหลือ 2 ครั้งให้ครบปริมาตร 6.4 มิลลิลิตร (ภาคผนวก 1ก)
4. ปิดฝาหลอดด้วย vinyl tape นำไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
5. นำไปแยกส่วนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนสารละลายใสลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร
6. ล้างตะกอนด้วย 80% ethanol นำไปหมุนเหวี่ยง เทสารละลายใสลงในขวดปรับปริมาตรเดิม ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง
7. ปรับปริมาตรให้ครบ 25 มิลลิลิตร ด้วย 80% ethanol จากนั้นนำไปเทลงในขวดพลาสติก โดยใช้กระดาษกรองเพื่อไม่ให้ตะกอนตกลงไป เมื่อได้สารละลายแล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น (สารละลายที่สกัดในส่วนนี้ใช้สำหรับวิเคราะห์น้ำตาล)
8. ส่วนกากที่เหลือนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการศึกษาความเข้มข้นของแป้งต่อไป

4.3.2 การย่อยแป้งในกากแห้ง

1. ชั่งกากอบแห้งที่ได้จากข้อ 4.3.1 มา 0.125 กรัม ใส่ลงในหลอดเซนติฟิวส์ขนาด 50 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำกลั่น 0.625 มิลลิลิตร
3. นำไปตั้งบนอ่างควบคุมอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
4. ยกลงมาเติมกรดเปอร์คลอริก 8.14 N ($HclO_4$)จำนวน 0.8125 มิลลิลิตร
5. ใช้แท่งแก้วคนให้ทั่วนาน 5 นาที จากนั้นคนเป็นครั้งคราวนาน 15 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. เติมน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร
7. นำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
8. เทส่วนของเหลวลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ระวังอย่าให้ตะกอนตกลงไป ตะกอนที่เหลือให้ทำซ้ำในขั้นตอนตั้งแต่เติมกรดเปอร์คลอริกอีกครั้ง
9. นำสารที่สกัดได้ไปปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรองและเก็บในขวดพลาสติก

4.3.3 การวิเคราะห์น้ำตาลรวม (Total sugar) โดยวิธี Phenol-sulphuric method ของ Dubois *et al.* (1956)

1. เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.04 และ 0.08 มิลลิกรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร (ภาคผนวก 2ก)
2. เตรียมสารละลายฟีนอล 5% (ภาคผนวก 3ก)
3. ดูดสารสกัดจากข้อ4.3.1จำนวน 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองจำนวน 3 หลอด สำหรับการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานให้ทำด้วยวิธีเดียวกัน
4. เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร
5. เติมฟีนอล 5% 1 มิลลิลิตร
6. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร
7. นำไปเขย่าทันทีด้วยเครื่องปั่น
8. ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเขย่าอีกครั้ง จากนั้นนำไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อลดอุณหภูมิลง
9. นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 485 นาโนเมตร
11. ในแต่ละตัวอย่างจะต้องทำ blank โดยการดูดตัวอย่าง 10 ไมโครลิตรลงในหลอดแก้ว เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร แล้วทำตามตั้งแต่ขั้นตอนที่ 6
12. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ของตัวอย่างมาลบออกด้วยค่าการดูดกลืนแสงของ blank ของแต่ละตัวอย่าง (ถ้าใกล้เคียง 0 มากสามารถตัดทิ้งได้) นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การคำนวณความเข้มข้นของน้ำตาล

$$\text{ความเข้มข้นของน้ำตาล} = \frac{X \times D \times F}{FW} \quad \text{ไมโครกรัม / กรัมน้ำหนักสด}$$

X = ค่าความเข้มข้นที่ได้จากการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

D = ปริมาตรของสารตัวอย่างที่ใช้เท่ากับ 10 ไมโครลิตร

F = ปริมาตรที่ใช้ในขั้นตอนการสกัดด้วย ethyl alcohol 80%

FW = น้ำหนักตัวอย่างสดที่นำมาสกัดด้วย ethyl alcohol 80% (กรัม)

4.3.4 การวิเคราะห์แป้ง (JSPN, 1990)

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส ที่ระดับ 0, 10, 20, 30, 40 และ50 ส่วนต่อล้าน
2. นำสารสกัดในข้อ 4.3.2 มาทำเป็นสารละลายเจือจางประมาณ 50 เท่า
3. ดูดสารละลายเจือจางที่ได้มา 2.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดแก้วที่ตั้งไว้ในกล่องน้ำแข็ง
4. เติมสารละลาย anthrone 5 มิลลิลิตร (ซึ่งได้จากการเตรียม anthrone 1 กรัม ในกรดซัลฟูริคเข้มข้น 500 มิลลิลิตร)
5. ปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่น แล้วรีบนำลงไปไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 7.5 นาที
6. นำไปแช่ในกล่องน้ำแข็งเพื่อลดอุณหภูมิ
7. นำออกมาตั้งไว้รอจนกระทั่งอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง
8. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร
9. ค่าที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับกราฟของสารละลายมาตรฐาน

การคำนวณ

$$\text{ความเข้มข้นแป้ง} = \text{ความเข้มข้นน้ำตาล} \times 0.9$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$$\text{ความเข้มข้นแป้งต่อน้ำหนักแห้ง} = \frac{X \times F \times d}{1000 \times D} \quad \text{มิลลิกรัม / กรัม น้ำหนักแห้ง}$$

X = ความเข้มข้นแป้ง (สตล)

F = ปริมาตรที่ใช้ในขั้นตอน hydrolysis

d = จำนวนเท่าที่เจือจาง 50 เท่า

D = น้ำหนักของตัวอย่างแห้งที่นำมาสกัด (กรัม)

สถานที่ทำการวิจัย

1. แปลงทดลอง ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. แปลงทดลอง สถานีวิจัยโครงการหลวงดอยอินทนนท์

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2543 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2546

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved