บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

พืชทดลอง

ลำไย (*Dimocarpus longan* Lour.)

สารเคมี

1. Potassium chlorate : $KClO_3$
2. 3-idolebutyric acid : IBA (Fluka ® ,Switzerland)
3. Polyvinylpyrrolidon: PVP (Sigma ® ,Germany)
4. Diethyl ether (LAB-SCAN ® ,Thailand)
5. Acetic acid (LAB-SCAN ® ,Thailand)
6. Methanol HPLC grade (Fisher Scientific® ,UK)
7. Ethanol (MERCK ® Germany)
8. Tissue freezing medium (Jung ® ,Germany)
9. Xylene (LAB-SCAN ® ,Thailand)

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดแสง (Digital luxmeter, Kenis ®, DX-100, UK)
2. เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC, SIMADZU ®, SCL- 10A VP, Fluorescence detactor, SIMADZU ®, RF - 10A XL, JAPAN)
3. เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography: GC, SIMADZU ®, 14B, JAPAN)
4. เครื่องตัดเนื้อเยื่อพืช (Freezing microtome, LEICA ®, CM1850, Germany)
5. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge, HERMLE ® , Z200A, Germany)
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge, KUBOTA ® , 6930, JAPAN)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7. เครื่องชั่งไฟฟ้า (Sartorius®, TE612-L, JAPA)
8. กล้องจุลทรรศน์ (Olympus®, BX51, JAPAN)
9. กล้องถ่ายรูป (Olympus®, BX51, JAPAN)

วิธีการทดลอง

1. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) 5 ซ้ำ โดยมีกรรมวิธีดังต่อไปนี้

1.1 ชุดควบคุม (ไม่ราดสารและไม่พรางแสง)

1.2 ชุดราดสาร (ราดสารโพแทสเซียมคลอเรตอัตรา 8 กรัมต่อตารางเมตรของทรงพุ่ม)

1.3 ชุดพรางแสง (พรางแสง 90 เปอร์เซ็นต์)

1.4 ชุดราดสารร่วมกับพรางแสง (ราดสารและพรางแสง)

โดยทำการทดลองในวันที่ 18 พฤศจิกายน- 23 ธันวาคม พ.ศ. 2548

2. การเตรียมต้นลำไย

2.1 การเลือกต้น ทำการทดลองในแปลงโครงการบ้านโป่งอันเนื่องมาจากพระราชดำริ โดยใช้ต้นลำไยพันธุ์ดอที่มี อายุ 4-5 ปี เลือกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางทรงพุ่ม 5 เมตร และมีการแตกใบ 1 ชุดหลังการตัดแต่งกิ่ง จำนวน 40 ต้น (ภาพ 1)

2.2 การบำรุงต้น ใส่ปุ๋ยเพื่อบำรุงต้น 200 กรัมต่อต้น โดยเตรียมจาก

- ปุ๋ยสูตร 25-7-7 จำนวน 2 ส่วน
- ปุ๋ยสูตร 46-0-0 จำนวน 2 ส่วน
- ปุ๋ยสูตร 0-0-60 จำนวน 1 ส่วน
- ปุ๋ยไมโครไซม์ เอ 1 จำนวน 1 ส่วน

ผสมปุ๋ยทั้ง 4 ชนิดให้เข้ากันหว่านรอบโคนต้น และทำการให้น้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 1 ลักษณะของต้นลำไยในแปลงทดลอง

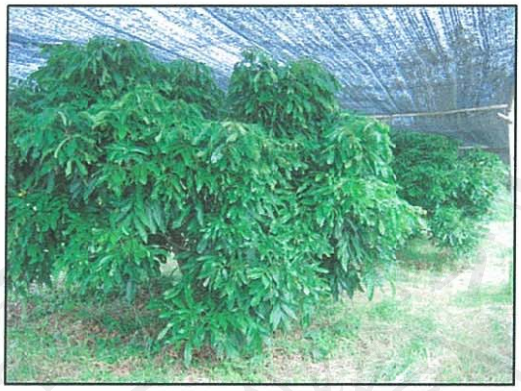
2.3 การให้น้ำ ในระยะการเตรียมต้นทำการให้น้ำโดยระบบมินิสปริงเกอร์สัปดาห์ละ 1 ครั้ง

3. การพรางแสงและการราดสารโพแทสเซียมคลอเรต

3.1 พรางแสงต้นลำไย หลังการแตกใบอ่อนชุดที่ 2 ประมาณ 3 สัปดาห์ ทำการพรางแสงต้นลำไยจำนวน 20 ต้น โดยใช้สแลนพรางแสงที่กรองแสงได้ประมาณ 50% พราง 2 ชั้น สามารถกรองแสงได้ประมาณ 90%(ทำการวัดแสงโดยใช้ digital luxmeter, Kenis ® DX-100) (ภาพ 2) และไม่พรางแสง 20 ต้น (ภาพ 3)

ภาพ 2 ลักษณะของต้นลำไยที่ไม่พรางแสงในแปลงทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 3 ลักษณะของต้นลำไยที่พรางแสงในแปลงทดลอง

3.2 ราดสารโพแทสเซียมคลอเรต เมื่อใบอ่อนชุดที่ 2 มีอายุประมาณ 3-4 สัปดาห์ (หลังการพรางแสง) ในอัตรา 8 กรัมต่อตารางเมตรของทรงพุ่ม โดยบดสารโพแทสเซียมคลอเรต ให้ละเอียด และโรยบริเวณทรงพุ่ม จากนั้นให้น้ำตามเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4. การเก็บตัวอย่าง

4.1 การเก็บตัวอย่าง shoot diffusates เก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 3, 7, 12, 14, 17, 21, 26, 28, 35 หลังกรรมวิธี โดยเก็บยอดลำไยยาว 5 เซนติเมตร จำนวน 3 ยอด จุ่มในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 15 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ในที่มืด อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส 20 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ใส่ขวดเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ภาพ 4) เพื่อรอการวิเคราะห์ปริมาณ IAA ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

4.2 การเก็บตัวอย่าง leaf diffusates เก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 3, 7, 12, 14, 17, 21, 26, 28, 35 หลังกรรมวิธี โดยเก็บใบย่อยลำไยคู่ที่ 2-3 ของใบประกอบ จำนวน 2 ใบจุ่มในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2.5 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ในที่มืด อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส 20 ชั่วโมง (ภาพ 5) หลังจากนั้นเก็บสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ใส่ขวดเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ภาพ 6) เพื่อรอการวิเคราะห์ปริมาณ IAA ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 4 ยอดลำไยที่จุ่มในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ก), และการดูดฟอสเฟตบัฟเฟอร์ใส่ขวดเพื่อเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ข)

ภาพ 5 การตัดใบลำไย (ก), การปักใบลำไยในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ข)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 6 การเก็บใบลำไยไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส 20 ชั่วโมง

4.3 การเก็บใบเพื่อวัดปริมาณเอทธีลีน เก็บใบย่อยลำไยคู่ที่ 2-3 ของใบประกอบประมาณ 12 ใบ ใส่กล่องที่ทราบปริมาตร เก็บในที่มืดอุณหภูมิห้อง 4 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ปริมาณเอทธิลีนด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี เก็บตัวอย่างทุกวันในสัปดาห์แรกและในวันที่ 12, 14, 17, 21, 26, 28, 35 หลังกรรมวิธี

4.4 การเก็บปลายยอดลำไย เก็บปลายยอดลำไยหลังราดสารโพแทสเซียมคลอเรตและพรางแสง ในวันที่ 0, 3, 7, 12, 14, 17, 21, 26, 28, 35 ยาวประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร แช่ในน้ำยารักษาสภาพ (formalin-acetic acid alcohol; FAA) (ภาพ 7) เพื่อทำ frozen section

ภาพ 7 ยอดลำไยที่แช่ในน้ำยารักษาสภาพ (FAA) เพื่อรอการทำ frozen section

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.5 การเก็บข้อมูลทางกายภาพ เก็บข้อมูลการออกดอกได้แก่ จำนวนวันที่ออกดอก เปอร์เซ็นต์การออกดอก และขนาดช่อดอก หลังการราดสารโพแทสเซียมคลอเรตและการพรางแสง เพื่อตรวจสอบการตอบสนองต่อการให้สารและการพรางแสง

5. ขั้นตอนการวิเคราะห์

5.1 การวิเคราะห์กรดอินโดล-3-แอซีติก

5.1.1 การสกัด shoot diffusates และ leaf diffusates ละลายตัวอย่างให้เป็นของเหลวแล้วเติม internal standard (3-idolebutyric acid: IBA) ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติม Polyvinylpyrrolidon: PVP ประมาณ 10 มิลลิกรัม เขย่า 3 นาทีแล้วตั้งทิ้งไว้ 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที ด้วยเครื่อง centrifuge นาน 10 นาที แยกสารละลายที่ได้ไปปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 2.5-3.0 ด้วย 4 M acetic acid แล้วจึงเติม diethyl ether ½ ส่วนของปริมาณตัวอย่าง เขย่านาน 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จะสังเกตเห็นสารละลายแยกชั้น ดูดสารละลายส่วนบนเพื่อนำไประเหยแห้ง แล้วเติม diethyl ether ทำซ้ำอีกหนึ่งครั้ง นำสารละลายที่ได้ไประเหยภายใต้ก๊าซไนโตรเจนจนแห้ง แล้วจึงทำละลายด้วย 50% methanol ที่มี 0.1 M acetic acid 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่อง microcentrifuge นาน 15 นาที เทสารละลายใส่หลอดเก็บตัวอย่าง เพื่อรอวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

5.1.2 การวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ดัดแปลงจากกรรมวิธีของ Koshita and Takahara (2004) ฉีดตัวอย่างที่สกัดปริมาณ 20 ไมโครลิตร โดยตั้งค่าเครื่องดังต่อไปนี้

Column	:	SC-150 (150PU.O mm) Prontosil 120-5-C18 ace-EPS 5.0 μm, BISCHOFF Chromatography ®
Mobile phase	:	B = 0.1 M acetic acid in methanol
		A = 0.1 M acetic acid in water

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Time Program :	Time	Event	value
	00.01	B. Conc	45.0
	12.50	B. Conc	85.0
	14.00	B. Conc	100.0
	15.00	B. Conc	100.0
	16.00	B. Conc	45.0
	22.00	B. Conc	45.0
	22.00	B. Conc	0.0

Flow rate : 1 ml/min.

Detector : Fluorescence

5.2 การวิเคราะห์ปริมาณเอทธีลีน

5.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณเอทธิลีน วัดด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี ตามกรรมวิธีของ Sanyal and Bangerth (1998) โดยดูดก๊าซในกล่องตัวอย่างที่เก็บในที่มืดอุณหภูมิห้อง นาน 4 ชั่วโมง ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่องเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี 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)

5.3 การศึกษาสัณฐานวิทยาของปลายยอด

5.3.1 การศึกษาโครงสร้างของปลายยอด ด้วยวิธี frozen section โดยดัดแปลงจากกรรมวิธีของ Johanson (1940) นำชิ้นส่วนปลายยอดฝังลงใน น้ำยา(tissue freezing medium) เพื่อยึดเนื้อเยื่อ นำไปตัดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่อง freezing microtome นำไปย้อมสี Delafield's hematoxylin ปิด cover slip บนกระจกสไลด์โดยใช้ permount นำไปวัดขนาดและบันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved