บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

พืชทดลอง

ลำไย (*Dimocarpus longan* Lour.)

สารเคมี

1. Acetonitri HPLC grade (LAB-SCAN®, Thailand)
2. Acetic acid AR grade (LAB-SCAN®, Thailand)
3. Ammonium acetate AR grade (Fisher Scientific®,UK)
4. Ammonium hydroxide, 28.0-30.00 % (JT-BAKER®, U.S.A)
5. Diethyl ether (LAB-SCAN®, Thailand)
6. di-Potassium hydrogen orthophosphate anhydrous AR grade (Fisher Scientific®,UK)
7. Hydrogen peroxide 30% (Merck®, Germany)
8. Methanol HPLC grade (LAB-SCAN®, Thailand)
9. Methanol AR grade (LAB-SCAN®, Thailand)
10. Potassium chlorate : $KClO_3$
11. Potassium dihydrogen orthophosphate AR grade (Fisher Scientific®,UK)
12. Polyvinylpyrolidon : PVP (Sigma®, Germany)
13. Sephadex (Fluka®, Switzerland)
14. Triethanolamine (Ajax Finechem®, Australia)
15. 3-idolebutyric acid : IBA (Fluka®, Switzerland)
16. Liquid nitrogen
17. Nitrogen Gas

อุปกรณ์

1. เครื่องโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC, SIMADZU®, JAPAN, RF-10A XL, Fluorimeter detector และ SPD-M10A VP, Diode Array detector)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. เครื่องก๊าซโครมาโทรกราฟี (Gas Chromatography: GC, SIMADSU®, 14B, JAPAN) Flame Ionized Detector (FID), Column Prontosil Hyper sort-b ODS 0.5 µm BISCHOFF Chromatography®

3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge, HERMLE®, Z200A, Germany)

4. เครื่องหมุนเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ (micro centrifuge, KUBOTA®, 6930, JAPAN)

5. เครื่องชั่งไฟฟ้า (Sartorius®, TE612-L, JAPAN)

6. เครื่องระเหยสารภายใต้สภาพแรงดันต่ำ (rotary evaporator, BUCHI®, Rota vapor R-114, Switzerland)

7. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH –meter, Sartorius PP-50®, TAIWAN)

8. เครื่องทำตัวอย่างให้แห้งโดยความเย็น (freeze dry, FTS®)

9. Vacuum pump (JOUAN®, RC 1010, Germany)

10. Ultrasonic bath(D.S.C GROUP®,Germany)

11. กรองแก้ว filter crucible 50 ml (DURAN®,258513406, Germany)

12. กล้องถ่ายรูป (Olympus®, BX51, JAPAN)

วิธีการทดลอง

1. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) 4 ซ้ำ โดยมี 4 กรรมวิธีดังต่อไปนี้

1.1 ไม่ราดสาร $KClO_3$ ต้นลำไยในระยะใบอ่อน

1.2 ราดสาร $KClO_3$ ในระยะใบอ่อน

1.3 ไม่ราดสาร $KClO_3$ เมื่อตัดใบอ่อนทิ้ง

1.4 ราดสาร $KClO_3$ เมื่อตัดใบอ่อนทิ้ง

2. การเตรียมต้นลำไย

2.1 การเลือกต้น ทำการทดลองที่แปลงลำไยโครงการบ้านโปงอันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ โดยใช้ต้นลำไยพันธุ์ดอที่มีอายุ 4-5 ปี เลือกต้นที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางทรงพุ่ม 5 เมตร และมีการแตกใบ 1 ชุดหลังการตัดแต่งกิ่ง จำนวน 20 ต้น (ภาพที่ 1)

2.2 การบำรุงต้น

ใส่ปุ๋ยคอก 500 กรัม และปุ๋ยเคมีเพื่อบำรุงต้น 200 กรัมต่อต้น โดยการเตรียมจาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- 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 ชนิดให้เข้ากันหว่านรอบโคนต้น และให้น้ำโดยระบบมินิสปริงเกอร์ สัปดาห์ละ 1 ครั้ง ครั้งละ 1-2 ชั่วโมง

ภาพที่ 6 ต้นลำไยอายุ 5 ปีที่ใช้ในการทดลอง

3. การตัดใบอ่อนและการราดสารโพแทสเซียมคลอเรต

3.1 การตัดใบอ่อนต้นลำไย หลังการแตกใบอ่อนชุดที่ 2 ทำการตัดใบอ่อนทั้งต้น (1 สัปดาห์หลังแตกใบอ่อน) ด้วยกรรไกรตัดกิ่งทั้งต้น แต่คงเหลือส่วนของยอดไว้ จำนวน 10 ต้น (ภาพที่ 8)

3.2 การราดสารโพแทสเซียมคลอเรต ทำการราดสารโพแทสเซียมคลอเรต ต้นที่ตัดใบอ่อน จำนวน 5 ต้น และต้นที่ไม่ตัดใบอ่อนจำนวน 5 ต้น โดยราดสารบริเวณรอบทรงพุ่ม อัตรา 8 กรัมต่อตารางเมตรของพื้นที่ทรงพุ่ม (ประมาณ 200 กรัมต่อต้น) จากนั้นให้น้ำตามเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 7 ลักษณะใบอ่อนของต้นลำไยพันธุ์ดอขณะพร้อมทำการทดลอง

ภาพที่ 8 การตัดใบอ่อนของต้นลำไย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การเก็บตัวอย่าง (Sample Collections)

เก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 7, 11, 14, 17, 21, 24, 32 และ 38 หลังกรรมวิธี

4.1 การเก็บตัวอย่าง leaf diffusates และ shoot diffusates เตรียมสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ pH 6.2 โดยใช้ปิเปตดูดสารละลายลงในถาดหลุมพลาสติก หลุมละ 2.5 มิลลิลิตร 12 หลุมต่อถาด ปิดฝาโดยบนฝาเจาะรูเพื่อสอดก้านใบและยอดลงในสารละลายฟอสเฟสบัพเฟอร์ สุ่มเก็บยอดลำไยจำนวน 5 ยอดต่อหนึ่งกรรมวิธี ตัดใบประกอบตำแหน่งที่ติดกับตายอด ตัดใบย่อยคู่ที่สองจุ่มก้านใบลงในถาดหลุม (multi plate) หนึ่งคู่ใบต่อหลุม และตัดปลายยอดยาวประมาณ 3 เซนติเมตร จุ่มลงในถาดหลุม หนึ่งยอดต่อหลุม จากนั้นเก็บไว้ในกล่องพลาสติก โดยรักษาความชื้นภายในกล่อง ด้วยการรองกระดาษทิชชู่ที่ก้นกล่องและใส่น้ำให้กระดาษทิชชู่เปียกชุ่ม ปิดฝากล่องพลาสติก ปิดรอยต่อของฝากล่องด้วยเทปกาวเพื่อรักษาความชื้นสัมพัทธ์ให้อยู่ระหว่าง 80-100 เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาในที่มืด อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง นำบัฟเฟอร์ที่ได้บรรจุลงในขวด เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ ปริมาณ IAA ด้วยเครื่องโครมาโทรกราฟฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

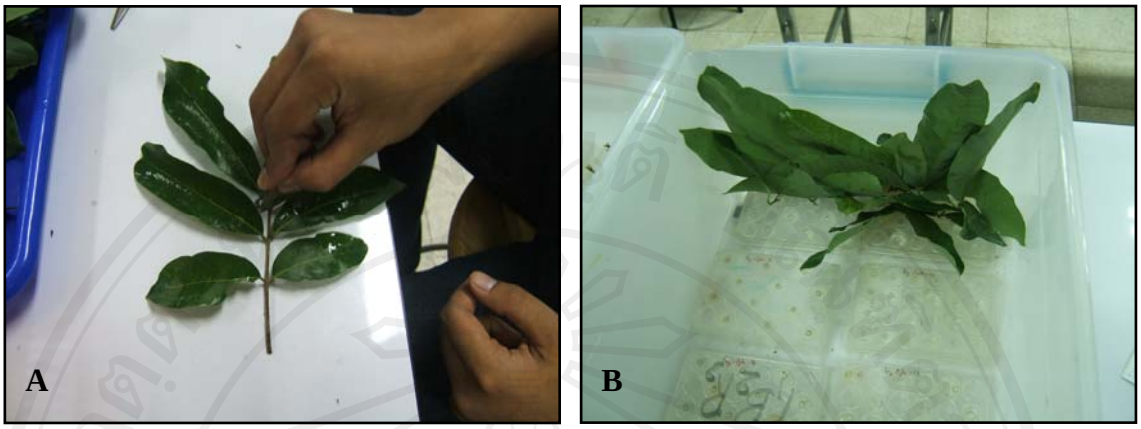
4.2 การเก็บปลายยอด เก็บตัวอย่างทุกกรรมวิธี โดยสุ่มเก็บตายอดครั้งละ 15 ยอดต่อกรรมวิธี ใส่ลงในไนโตรเจนเหลวทันที จากนั้น นำตัวอย่างเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ปริมาณ IAA และไซโตไคนินด้วยเครื่องโครมาโตกราฟฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

4.3 การเก็บใบสำหรับวิเคราะห์ปริมาณเอทิลีน โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างใบย่อยลำไยจำนวน 12 ใบย่อย น้ำหนักประมาณ 14-15 กรัม/ซ้ำ บรรจุใบในกระบอกฉีดยา ปริมาตร 50 มล. แล้วปิดปลายกระบอกฉีดยาด้วยซิลิโคนเพื่อป้องกันการรั่วไหล เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จึงนำไปวิเคราะห์ปริมาณเอทิลีนด้วยเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟฟี

5. การเก็บข้อมูลทางกายภาพ

หลังการราดสารโพแทสเซียมคลอเรตและการตัดใบอ่อน เก็บข้อมูลการออกดอกได้แก่ จำนวนวันที่เกิดการแทงช่อดอก เปอร์เซ็นต์การออกดอก ความกว้าง และความยาวช่อดอก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

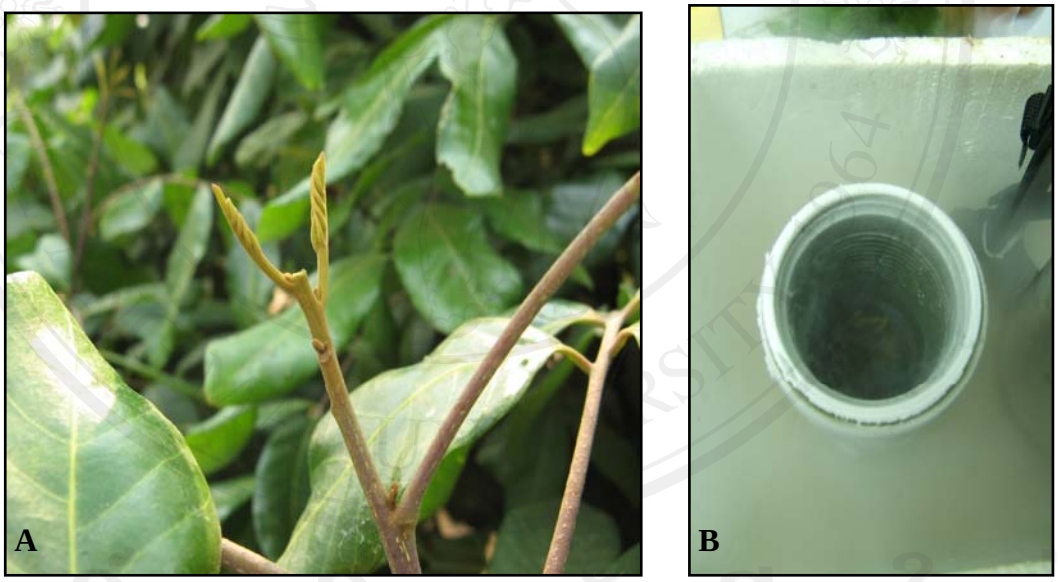


ภาพที่ 9 แสดงการตัดใบลำไย (A), การปักใบลำไยในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (B)

ภาพที่ 10 ลักษณะยอดลำไยที่เก็บตัวอย่าง (A), การปักยอดลำไยในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (B)

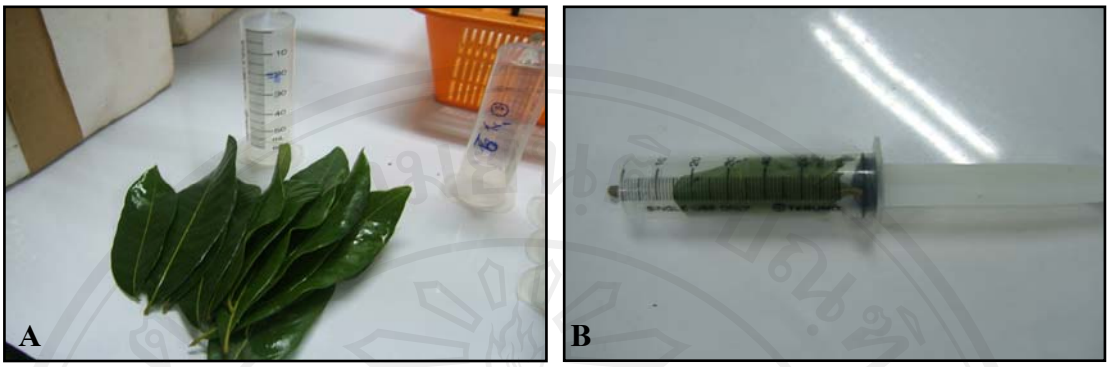
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 11 แสดงลักษณะกล่องพลาสติกปิดสนิท ปิดทับด้วยเทปกาวเพื่อรักษาความชื้นสัมพัทธ์



ภาพที่ 12 การเก็บยอดลำไย (A) และการใส่ลำไยในไนโตรเจนเหลว (B)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 13 ใบลำไยสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณเอทิลีนประมาณ 12 ใบ (A) และการใส่ในกระบอกฉีดยาปริมาตร 50 มิลลิลิตร (B)

6. การวิเคราะห์ปริมาณ diffusible IAA จากใบและปลายยอด

6.1 การทำให้บริสุทธิ์ (Purification) ละลายสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้เป็นของเหลว เติม internal standard (3-indolebutyric acid: IBA) ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติม Polyvinylpyrrolidon (PVP) 10 กรัม เขย่า 3 นาทีแล้วตั้งทิ้งไว้ 2 นาที เทสารละลายส่วนที่ใส นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง นาน 10 นาที เทสารละลายส่วนที่ใสมาปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 2.5-3.0 ด้วย acetic acid ความเข้มข้น 4 M แล้วเติม diethyl ether ครึ่งส่วนของปริมาตรตัวอย่าง เขย่า 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จะเห็นการแยกชั้นของสารละลาย ดูดสารละลายส่วนบนออก เติม diethyl ether ปริมาณเท่ากัน ทำซ้ำอีกหนึ่งครั้ง นำสารละลายส่วนบนที่ได้ทั้งสองครั้งรวมกันแล้วนำไประเหยแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน หลังจากนั้นเติมเมทธานอล (HPLC grade) ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ด้วยเครื่อง microcentrifuge เทสารละลายส่วนที่ใสใส่หลอดเก็บตัวอย่าง เพื่อรอการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทรกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

6.2 การวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทรกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงดัดแปลงจากกรรมวิธีของ Koshita and Takahara (2004) ฉีดตัวอย่างที่สกัดปริมาณ 20 ไมโครลิตร โดยตั้งค่าเครื่องดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

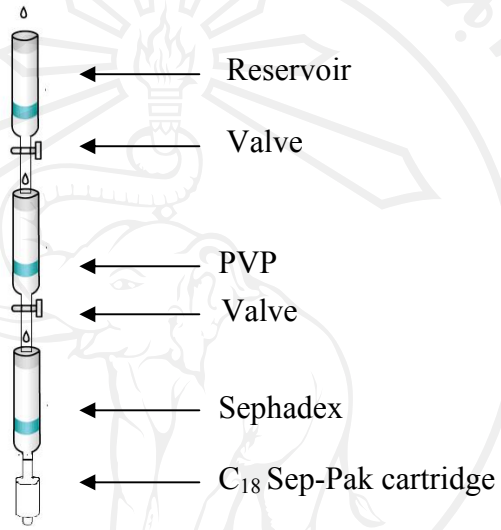
Column	:	SC-150 (150PU.O mm)		
		Prontosil 120-5-C18 ace-EPS 5.0 μm,		
		BISCHOFF Chromatography®		
Mobile phase	:	A = 0.1 M acetic acid in water		
		B = 0.1 M acetic acid in methanol		
Time Program	:	Time	Event	value
		00.01	B.conc	45.0
		12.50	B.conc	85.0
		14.00	B.conc	100.0
		16.00	B.conc	45.0
		22.00	B.conc	00.0
Flow rate	:	1 ml/min		
Detector	:	Fluorimeter		

7. การวิเคราะห์ปริมาณ cytokinins จากเนื้อเยื่อส่วนปลายยอด

7.1 การสกัดตัวอย่างยอด นำตัวอย่างยอดที่เก็บไว้ไปทำให้แห้งด้วยความเย็นภายใต้สภาพสุญญากาศ ด้วยเครื่อง freeze dryer บดตัวอย่างยอดแห้งของลำไยน้ำหนักประมาณ 0.1-0.3 กรัม ให้ละเอียดด้วยโกร่ง โดยเติมไนโตรเจนเหลวขณะทำการบดเพื่อรักษาสภาพความเย็น เติมเมทธานอลเย็น (เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส) ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ 50 มิลลิลิตร เก็บสารสกัดใส่ขวดปิดฝาไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง กรองสารสกัดด้วย grassinter-filter ลงในขวดก้นกลม (rotary flask) นำสารละลายไประเหยแห้งด้วย Rotary evaporator ล้างสารสกัดในขวดก้นกลมด้วย ammonium acetate 0.01 M 3 ครั้ง ๆ ละ 4 มิลลิลิตร โดยใช้ ultrasonic bath เก็บสารละลายที่ได้ทั้ง 12 มิลลิลิตรรวมกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมงจากนั้นนำตัวอย่างมาละลายให้เป็นของเหลวแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,500 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที แยกสารละลายส่วนใสไปผ่านคอลัมน์ ที่ประกอบไปด้วยหลอดใส่สารละลาย (reservoir), polyvinylpyrolidone (PVP), Sephasex และ C_{18} Sep-Pak cartridge (ภาพที่ 14) เมื่อผ่านสารละลายลงในคอลัมน์เสร็จแล้ว หลังจากนั้น นำ C_{18} Sep-Pak cartridge มาชะ (Elute) ฮอร์โมนไซโตไคนินด้วยสารละลายเมทธานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ในกรดอะซิติก 0.1 โมล หลังจากนั้นนำ C_{18} Sep-Pak cartridge ชิ้นใหม่ต่อเข้ากับระบบคอลัมน์ ถอดส่วนของ PVP ออก แล้วผ่านสารละลายกรดเข้มข้น 3 M acetic acid 15 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ Sephadex เมื่อผ่านสารละลายลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในคอลัมน์แล้ว ชะฮอร์โมน IAA จาก C_{18} Sep-Pak ด้วยสารละลายเมทธานอลความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ในกรดอะซิติก 0.1 โมล นำสารละลายฮอร์โมนที่ชะได้ไประเหยแห้งภายใต้สุญญากาศด้วยเครื่อง Vacuum pump จากนั้นละลายส่วนที่แห้งด้วยเมทธานอลความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร โดยใช้ ultrasonic bath เก็บสารละลายฮอร์โมน เพื่อรอการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทรกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง



ภาพที่ 14 ส่วนประกอบของคอลัมน์ที่ใช้ในการทำสารให้บริสุทธิ์ (Purification)

7.2 การวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทรกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงดัดแปลงจากกรรมวิธีของ Koshita and Takahara (2004) ฉีดตัวอย่างที่สกัดปริมาณ 20 ไมโครลิตร โดยตั้งค่าเครื่องสำหรับการวิเคราะห์ IAA ดังที่กล่าวมาข้างต้น สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไซโตไคนินตั้งค่าเครื่องดังนี้

Column	:	Prontosil Hyper sort-b ODS 0.5 µm
		BISCHOFF Chromatography®
Mobile phase	:	A= 0.1 M acetic acid in water
		(ปรับpH 3.4 ด้วย Triethanolamine) + 50 ml ACN
		B = Acetonitrile
Flow rate	:	1 ml/min

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Time Program	:	Time	Event	value
		00.01	B.conc	10.0
		20.00	B.conc	40.0
		25.00	B.conc	70.0
		27.00	B.conc	10.0
		30.00	B.conc	10.0
Flow rate	:	1 ml/min		
Detector	:	Diode Array = 265 nm.		

8. การวิเคราะห์ปริมาณเอทิลีน

8.1 การวิเคราะห์ปริมาณเอทิลีน วัดด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี ตามกรรมวิธีของ Sanyal and Bangerth (1998) โดยดูดก๊าซจากหลอดตัวอย่างที่เก็บในที่มืด อุณหภูมิห้องนาน 4 ชั่วโมง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี โดยตั้งค่าเครื่องดังนี้

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)

9. ระยะเวลาในการทำการทดลอง

พฤศจิกายน 2549 – ตุลาคม 2550

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved