บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เมล็ดผักที่ใช้ทดลอง

1.1 เมล็ดผักกาดขาวปลี รวมทั้งหมด 6 สายพันธุ์ แบ่งออกเป็น

- เมล็ดผักกาดขาวปลี ที่ได้มาจากศูนย์วิจัยพืชผักแห่งเอเชีย (Asian Vegetable Research and Development Center : AVRDC) 2 สายพันธุ์ คือ #23 77M (3)-27 ซึ่งได้ทำการขยายเมล็ดพันธุ์ในโครงการวิจัยผัก คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- เมล็ดผักกาดขาวปลี ที่ได้มาจาก บริษัท เจียไต๋ จำกัด 1 สายพันธุ์ คือ #61
- เมล็ดผักกาดขาวปลี ที่มีวางจำหน่ายตามท้องตลาด ตรงตามความนิยมของเกษตรกร 3 สายพันธุ์ คือ ตราช้าง ตราปลาวาฬ และตราเครื่องบิน

1.2 เมล็ดผักกาดเขียวปลี รวมทั้งหมด 6 สายพันธุ์ แบ่งออกเป็น

- เมล็ดผักกาดเขียวปลี ที่ได้มาจาก โครงการวิจัยผัก คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2 สายพันธุ์ คือ 2I13 และ 2I18
- เมล็ดผักกาดเขียวปลี ที่ได้มาจากประเทศจีน 1 สายพันธุ์ คือ #64
- เมล็ดผักกาดเขียวปลี ที่มีวางจำหน่ายตามท้องตลาด ตรงตามความนิยมของเกษตรกร 3 สายพันธุ์ คือ ตราปลาวาฬ ตราปลาทอง ตราเครื่องบิน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. สถานที่วิจัยและรวบรวมข้อมูล

2.1 แปลงปลูก

แปลงทดลอง ศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2.2 ทำความสะอาดเมล็ด

ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2.3 เก็บรักษาและตรวจสอบความงอก

ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2.4 วิเคราะห์สารยับยั้งการงอก

ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3. ระยะเวลาในการวิจัย

เริ่มตั้งแต่ วันที่ 1 พฤศจิกายน 2531 ถึงวันที่ 30 มิถุนายน 2532 ดังต่อไปนี้ คือ

3.1 เตรียมต้นกล้าก่อนปลูก

วันที่ 1 พฤศจิกายน ถึงวันที่ 22 ธันวาคม 2531

3.2 การปลูกและดูแลรักษา

วันที่ 23 ธันวาคม 2531 ถึงวันที่ 20 กุมภาพันธ์ 2532

3.3 เก็บเกี่ยวและทำความสะอาดเมล็ด

วันที่ 21 กุมภาพันธ์ ถึงวันที่ 15 มีนาคม 2532

3.4 เก็บรักษา และทดสอบความงอก

วันที่ 18 มีนาคม ถึงวันที่ 25 พฤษภาคม 2532

3.5 วิเคราะห์สารยับยั้งการงอก

วันที่ 18-25 มีนาคม 2532

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6 วิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผล

วันที่ 1-30 มิถุนายน 2532

4. การปลูกเพื่อเก็บเกี่ยวเมล็ด

- โดยการเพาะเมล็ดผักกาดขาวปลี และเมล็ดผักกาดเขียวปลี ทุกสายพันธุ์ลงในจานแก้ว (petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่มีกระดาษซับสองชั้นที่ชื้นรองรับอยู่ ใช้ปากคีบ (forcep) จัดเมล็ดให้ห่างกันพอสมควร หลังจากเมล็ดเริ่มงอกได้ 2 วัน จึงนำจานแก้วทั้งหมดไปวางไว้ในตู้ทำความเย็นอุณหภูมิต่ำ (5-10 °ซ) เป็นเวลา 10-15 วัน เพื่อกระตุ้นให้ต้นกล้าแทงช่อดอกเร็วขึ้นหลังจากย้ายปลูกลงแปลง นำจานแก้วออกจากตู้ทำความเย็นในตอนเช้า พอตอนบ่าย ย้ายต้นกล้ามาชำลงในถุงพลาสติก ขนาด 4 x 6 นิ้ว เมื่อต้นกล้ามีใบจริง 4-6ใบ (ในระยะเวลา 25-30 วัน) จึงคัดต้นที่สมบูรณ์ตามลักษณะที่ต้องการก่อนย้ายปลูกลงในแปลง

- เตรียมแปลงปลูกแบบยกร่องขนาดแปลง 1.2 x 6 เมตร ปลูก 2 แถว ๆ ละ 15 ต้น ระยะปลูก 40 x 40 เซนติเมตร วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block (RCB) ระยะการเก็บเกี่ยว หลังดอกบาน 21-30 31-40 และ 41-50 วัน เป็นวิธีการ มี 4 ซ้ำ ในแต่ละสายพันธุ์

5. การดูแลรักษา

- การใส่ปุ๋ย ใส่ปุ๋ยเคมี 15-15-15 อัตรา 25 กิโลกรัม/ไร่ ในระยะรองพื้นก่อนปลูก หลังปลูกได้ 7-10 วัน ใส่ปุ๋ยยูเรียอัตรา 25 กิโลกรัม/ไร่ และเมื่อเริ่มติดเมล็ดจะใส่ปุ๋ย 13-13-21 อัตรา 25 กิโลกรัม/ไร่ อีกครั้งหนึ่ง

- การให้น้ำ ให้น้ำไปตามร่องปลูก และใช้บัวตักรด

- การคลุมฟาง คลุมฟางหลังย้ายปลูกลงแปลงเพื่อรักษาความชื้นและป้องกันวัชพืช

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- การป้องกันโรคและแมลง รองพื้นก่อนปลูกด้วยสารเคมีที่ฆ่าแมลงชื่อฟูราดาน และทำการฉีดพ่นสารป้องกันกำจัดโรคและแมลงได้แก่ copper oxychloride, methomyl และพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย Bacillus thuringiensis ทุกสัปดาห์ ตั้งแต่เริ่มติดฝักจนกระทั่งเก็บเกี่ยว

- การกำจัดวัชพืช ทำการกำจัดวัชพืชโดยใช้แรงงานคนในระยะแรกของการเจริญเติบโต ประมาณ 1-2 ครั้ง

- การเด็ดยอดของช่อดอก เพื่อช่วยให้ฝักส่วนล่างเจริญเติบโตและเมล็ดสมบูรณ์ขึ้น

6. การเก็บเกี่ยว

หลังจากดอกบานประมาณ 50 เปอร์เซนต์ ใช้เชือกไหมพรมสีต่างกัน ผูกดอกเพื่อแยกระยะการเก็บเกี่ยวเมล็ดออกเป็นระยะต่าง ๆ กัน โดยแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ

- ระยะหลังดอกบาน 21-30 วัน
- ระยะหลังดอกบาน 31-40 วัน
- ระยะหลังดอกบาน 41-50 วัน

7. การเก็บรักษา

หลังจากเก็บเกี่ยวนำเมล็ดของทุกระยะไปผึ่งแดดให้แห้ง นำเมล็ดมาทำความสะอาดโดยใช้เครื่องเป่าเมล็ด (seed blower) ปรับอัตราเร็วของลมให้เหมาะกับปริมาณเมล็ดที่นำเข้าเป่า หลังจากนั้น บรรจุเมล็ดใส่ถุงกระดาษสีน้ำตาล เก็บไว้ในภาชนะดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง (28-35 °ซ)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8. วิธีการศึกษา

8.1 ความงอกของเมล็ดแต่ละระยะการเก็บเกี่ยว

เมล็ดแต่ละระยะการเก็บเกี่ยว (ภาพที่ 4 และ 5) เมื่อเก็บเกี่ยวใหม่ ๆ จะนำมาเพาะทันที และนำออกมาทดสอบความงอกทุกเดือนจนครบ 2 เดือน

8.2 การทำลายการพักตัวของเมล็ด

นำเมล็ดที่เก็บเกี่ยวมาใหม่ ๆ มาทำลายการพักตัว โดยวิธีการต่าง ๆ ดังนี้ คือ

8.2.1 เพาะเมล็ดในจานแก้ว แล้วทำให้กระดาษเพาะชื้น โดยหยดสารละลาย KNO_3 ความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับ คือ 0.1, 0.2 และ 0.3 % ซึ่งเตรียมโดยละลาย KNO_3 0.1, 0.2 และ 0.3 g ในน้ำกลั่น 100 ml ตามลำดับ นำเมล็ดไปทดสอบความงอก ถ้ากระดาษเพาะเริ่มแห้งให้เติมด้วยน้ำกลั่น

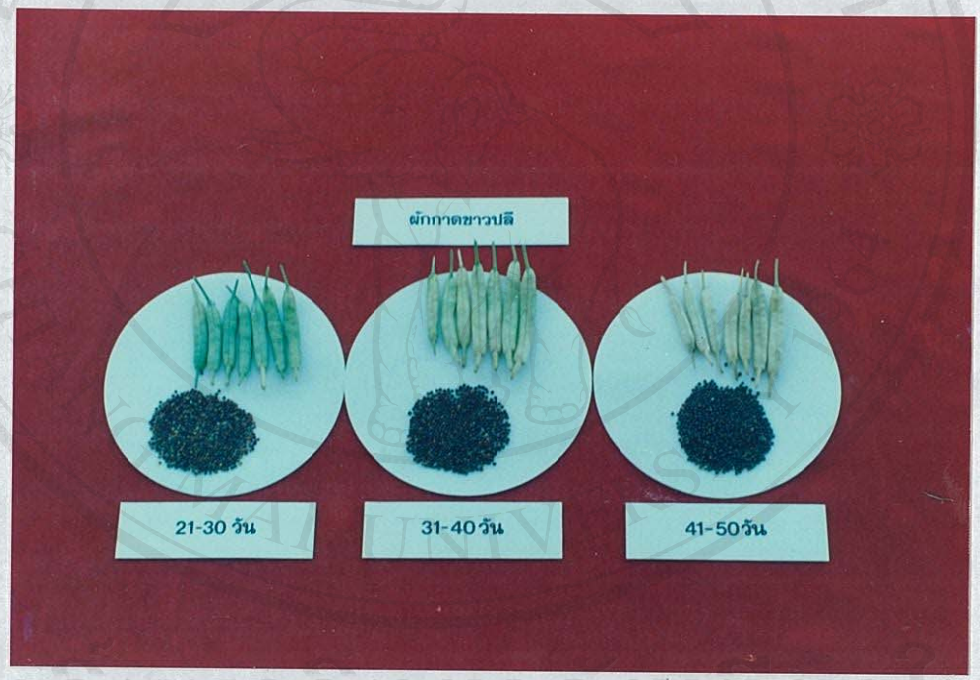
8.2.2 เพาะเมล็ดในจานแก้ว แล้วทำให้กระดาษเพาะชื้นด้วยน้ำกลั่น นำไปผ่านความเย็น (prechill) อุณหภูมิ 5-10 °ซ ในระยะเวลาต่างกัน 3 ระดับ คือ

- เมล็ดผักกาดขาวปลี ใช้ระยะเวลา 1, 3 และ 5 วัน
- เมล็ดผักกาดเขียวปลี ใช้ระยะเวลา 5, 7 และ 9 วัน

หลังจากเมล็ดผ่านความเย็นแล้วจึงนำไปทดสอบความงอก ถ้ากระดาษเพาะเริ่มแห้งให้เติมด้วยน้ำกลั่น

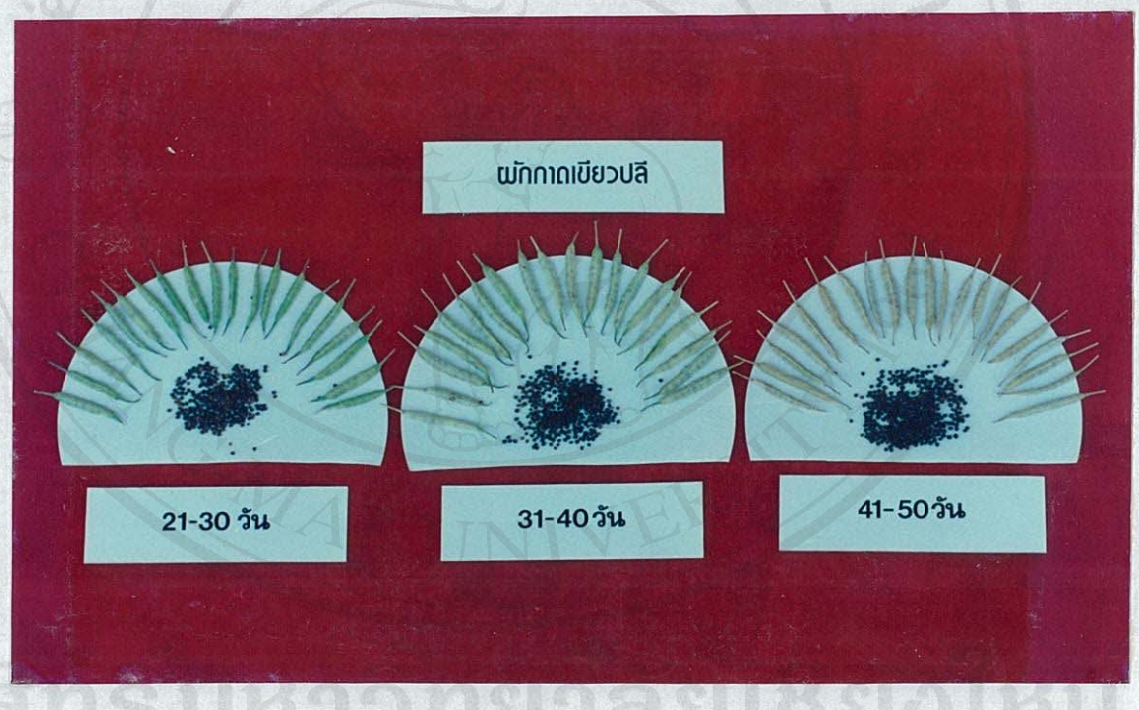
8.2.3 เพาะเมล็ดในจานแก้ว แล้วทำให้กระดาษเพาะชื้น โดยหยดสารละลาย GA_3 ความเข้มข้นต่างกัน 4 ระดับ คือ 200, 300, 400 และ 500 ppm ซึ่งเตรียมโดยละลาย GA_3 200, 300, 400 และ 500 mg ในน้ำกลั่น 1000 ml ตามลำดับ นำเมล็ดไปทดสอบความงอก ถ้ากระดาษเพาะเริ่มแห้งให้เติมด้วยน้ำกลั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



<u>ภาพที่ 4</u> เมล็ดผักกาดขาวปลี ที่ระยะการเก็บเกี่ยวหลังดอกบาน 21-30 วัน 31-40 วัน และ 41-50 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 5 เมล็ดผักกาดเขียวปลี ที่ระยะการเก็บเกี่ยวหลังดอกบาน 21-30 วัน 31-40 วัน และ 41-50 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8.3 การทดสอบความงอก

ใช้วิธีเพาะเมล็ดแบบ covered petri dish คือเพาะเมล็ดในจานแก้ว ที่มีกระดาษเพาะชับสองชั้นรองรับอยู่ เมล็ดจากระยะการเก็บเกี่ยวของแต่ละสายพันธุ์เป็นซ้ำ มี 4 ซ้ำ ๆ ละ 100 เมล็ด/วิธีการ นำไปวางไว้ในตู้เพาะอุณหภูมิ 25 °ซ ในสภาพมีแสง บันทึกข้อมูลเมล็ดผักกาดขาวปลี โดยการนับครั้งแรก หลังเพาะ 3 วัน และนับครั้งสุดท้ายหลังเพาะ 10 วัน ส่วนเมล็ดผักกาดเขียวปลี นับครั้งแรกหลังเพาะ 3 วัน และนับครั้งสุดท้ายหลังเพาะ 7 วัน (จวงจันทร์, 2529ก)

8.4 การวิเคราะห์สารยับยั้งการงอก

เมล็ดแต่ละระยะการเก็บเกี่ยวที่มีการพักตัว จะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารยับยั้งการงอก ABA โดยการใช้ High performance liquid chromatography (HPLC) (Ciha et al, 1977 ; Hein et al, 1984 ; Takahashi, 1986) รุ่น (model) 510 ผลิตโดยบริษัท Waters Associates จำกัด

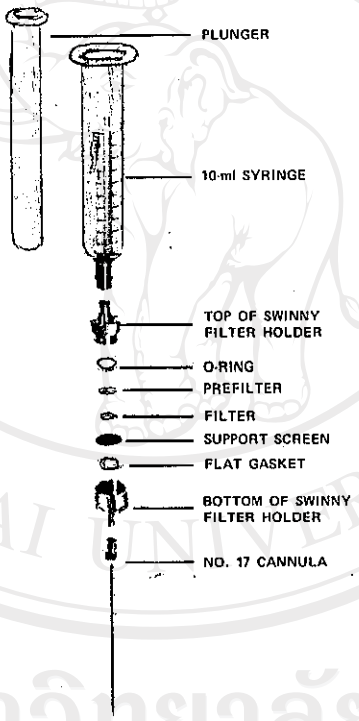
8.4.1 อุปกรณ์ในการกรองสารละลายก่อนใช้ HPLC (Sample Clarification Kit) ประกอบด้วย glass syringe ขนาด 10 ml, cannula#17, smooth-tip forcep, Swinny filter holder, Millipore filterและ prefilter (ภาพที่ 6)

8.4.2 ขั้นตอนการวิเคราะห์ (ภาพที่ 7)

ก. แช่เมล็ดที่บดละเอียดในสารละลาย methanol (CH_3OH) 80% โดยใช้ปริมาตร 20 ml/น้ำหนักเมล็ด 1 g นาน 24 ชั่วโมง กรองสารละลายเก็บไว้

ข. นำสารละลายที่กรองได้มาทำให้เจือจาง โดยทำให้สารละลายที่ทำให้เจือจางแล้ว ประกอบด้วย methanol 35% + acetic acid (CH_3COOH) 0.1% + H_2O 64.9%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 6 ส่วนประกอบของอุปกรณ์ในการกรองสารละลายก่อนใช้ HPLC

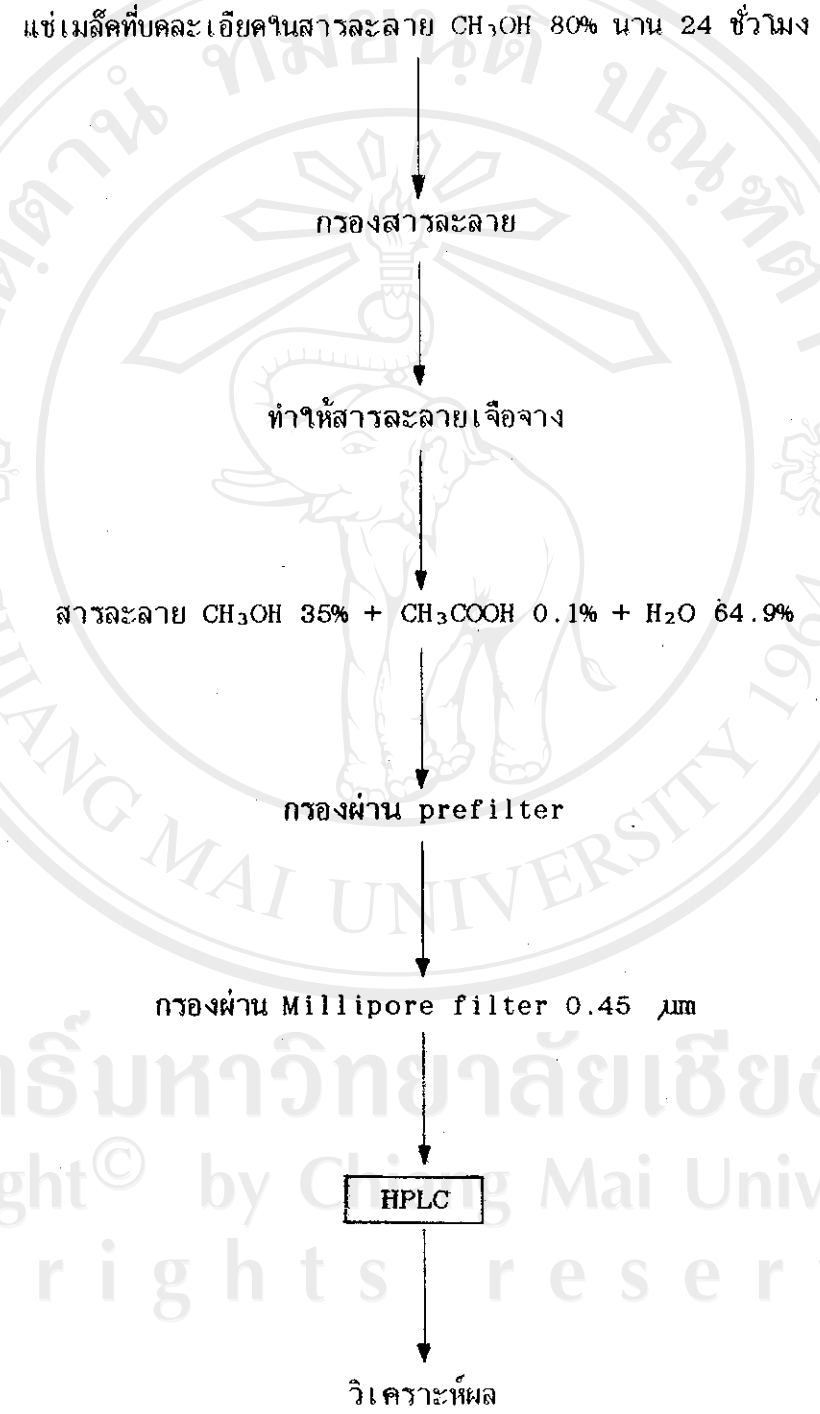
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค. กรองสารละลายในข้อ ข. ผ่าน prefilter แล้วนำมากรองผ่าน Millipore filter 0.45 μm ซึ่งอยู่ใน syringe ขนาด 10 ml อีกครั้ง

ง. ใช้ syringe ฉีดสารละลายที่ได้ 10 μl เข้าไปในเครื่อง HPLC ที่ประกอบด้วย column C_{18} (μ Bodapak C_{18}) สำหรับให้สารละลายผ่าน ปรับเครื่อง HPLC ให้มี flow rate 1.5 ml/min, chart speed 0.25 cm/min ความยาวคลื่น (UV absorbance) 254 nm, % transmitance 79.3-80.3, range 0.08 และ volts full scale = 0.01-0.1 โดยมี mobile phase ประกอบด้วย methanol 35% + acetic acid 0.1 % + H_2O 64.9%

จ. วิเคราะห์ผลการทดลองจากกราฟ โดยการหาพื้นที่ใต้กราฟนำมาเปรียบเทียบกับสาร ABA [($\pm$) - abscisic acid ($C_{15}H_{20}O_4$)] ที่มีความเข้มข้น 50 ppm ซึ่งใช้เป็น standard

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 7 ขั้นตอนการวิเคราะห์ ABA โดยใช้ HPLC

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved