บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 การหาตำแหน่ง Range of front (R_f) on paper chromatography ที่มี activity ของสารคล้ายไซโตไคนินในยอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้าในช่วงก่อนแตกใบอ่อน 1 สัปดาห์ โดยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay (SHB)

วัตถุประสงค์ เพื่อหาตำแหน่ง R_f ที่มี activity ของสารคล้ายไซโตไคนินในยอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้า เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ สุ่มสมบูรณ์ มี 11 วิธีการ ใช้ R_f 0.0-1.0 เป็นวิธีการ ทำ 10 ซ้ำ โดย 1 หน่วยการทดลอง คือ hypocotyl 8 ชิ้น ยาวชิ้นละ 1 มิลลิเมตร (ดัดแปลงจาก ชัยวัฒน์, 2542)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างพืช (sample preparation) (ดัดแปลงจาก ดรุณี , 2539)

ตัดยอดมะปรางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (วัดที่โดนกิ่ง) ประมาณ 0.3-0.4 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร จำนวน 40 ยอด(ตัดใบทิ้งให้หมด)เป็นหนึ่งตัวอย่าง เก็บใส่ถุงพลาสติกมัดปากถุง แล้วแช่น้ำแข็งในกระติกน้ำแข็ง แล้วนำไปสกัดในข้อต่อไป(ใช้ระยะเวลาที่เก็บตัวอย่างจนถึงการสกัด 4 ชั่วโมง)

2. การสกัด (extraction) (ดัดแปลงจาก ดรุณี , 2539)

นำยอดมะปราง 40 ยอดที่เก็บไว้ในแต่ละถุงมาบดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องบด (blender ขนาด 750 Watts) จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ - 20 ^{0}ซ เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างสดให้ได้ประมาณ 30 กรัมต่อ 1 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) จากนั้นนำตัวอย่างสดที่บดแล้วใส่ใน erlenmeyer flask ขนาด 500 มล แล้วเติม ethanol (Lab grade) 80 % ในอัตราส่วน 1 กรัมสด ต่อ ethanol 10 มล ปิด erlenmeyer flask ด้วยจุกยาง เขย่าสารละลายให้ผสมกัน ปิดปากขวดด้วยถุงพลาสติก รัดยางแล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ^{0}ซ เป็นเวลาประมาณ 17 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วนำสารละลายที่กรองได้ไปลดปริมาตรด้วยเครื่องระเหยความดันต่ำ (vacuum rotary evaporator) ในสภาพสูญญากาศที่ 600 mm Hg อุณหภูมิ 45 ^{0}ซ จนเหลือปริมาตร 50 มล จากนั้นปรับ pH ให้ได้ 2.5 ด้วยกรด HCl (Lab grade) 6 N

3. การแยกส่วน (partitioning) (ดัดแปลงจาก ดรุณี , 2539)

นำสารละลายที่ปรับ pH แล้วมาแยกส่วนโดยใช้ ethyl acetate 100 % (Lab grade) ในอัตราส่วนตัวอย่างสด 1 กรัม ต่อ ethyl acetate 1.5 มล โดยใส่กรวยแยก (separatory funnel) เขย่าสารละลายให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้จนสารละลายแยกชั้น ให้แยกเอาส่วนล่างซึ่งเป็นสารที่ละลายในน้ำ (water phase) ปริมาตรประมาณ 40 มล (เทียบเท่าน้ำหนักสด 30 กรัม) นำไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

4. การทำให้บริสุทธิ์ (purification) (ดัดแปลงจาก โรจน์รวี , 2538)

4.1 การกำจัดสิ่งเจือปนและสารยับยั้งการเจริญเติบโต โดยใช้ column chromatography นำสารละลายส่วน water phase ปริมาตร 10 มล ผ่านลงใน column ซึ่งบรรจุ Dowex 50 W Cation Resin 8 x 100 (ขนาด 50-100 mesh) [Sigma chemical company MO U.S.A.] column ที่ใช้คือ burette ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ยาว 25 เซนติเมตร ความสูงของ Dowex 50 W Resin ซึ่งบรรจุใน burette ประมาณ 20 เซนติเมตร การบรรจุ Dowex 50 w Resin ใส่ใน burette นั้นต้องแช่ Dowex 50 W Resin ในน้ำกลั่นประมาณ 20 นาที เพื่อให้ Dowex 50 W Resin ขยายตัวเต็มที่ก่อนจึงบรรจุลงใน burette

จากนั้นล้าง column ด้วยน้ำกลั่นประมาณ 100 มล แล้วจึงผ่านสารละลายส่วน water phase ลงใน column ครั้งละ 10 มล ปล่อยให้สารละลายไหลผ่าน column ในอัตราเร็วประมาณ 2 มล ต่อนาที

เมื่อสารละลายลดระดับลงจนใกล้จะถึงผิวหน้าของ Resin แล้วเริ่มล้างด้วยน้ำกลั่น 20 มล ในอัตราเร็วเดียวกัน เมื่อน้ำกลั่นลดระดับใกล้ถึงผิวหน้าของ Resin เติม ethanol (Lab grade) 70 % 20 มล แล้วปรับให้ไหลผ่าน column ในอัตราเร็วเดียวกัน เมื่อ ethanol ลดระดับใกล้ถึงผิวหน้าของ Resin เติมน้ำกลั่น 10 มล ล้างในอัตราเร็วเดียวกัน สารละลายทั้งหมดที่ไหลออกมาให้ทิ้งไป ในขั้นตอนนี้ไซโตไคนินที่อยู่ใน water phase เมื่อผ่าน column แล้วไซโตไคนินจะถูกดูดยึดโดย Dowex Resin ส่วน hormones หรือ inhibitors ตัวอื่น ๆ จะไม่ถูกดูดยึดโดย Dowex Resin ดังนั้นจะเหลือเฉพาะสารคล้ายไซโตไคนินและสารที่เป็น cation อยู่ใน column

จากนั้นเติม NH_4OH (Lab grade) 5 N 20 มล แล้วปล่อยให้ชะล้างในอัตราเร็วประมาณ 0.5 มล ต่อนาที (หากปล่อยให้ชะเร็วเกินไปจะเกิดความร้อนมากจนเดือดได้) เก็บสารละลายที่ผ่านออกมาเมื่อชะด้วย NH_4OH (Lab grade) 5 N เมื่อ NH_4OH ลดระดับลงใกล้จะถึงผิวหน้าของ Resin เติมน้ำกลั่นอีก 20 มล แล้วเก็บสารละลายที่ผ่านออกมา เมื่อล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นครั้งสุดท้าย ซึ่งจะมีปริมาตรรวมกันประมาณ 40 มล ในขั้นตอนนี้สารคล้ายไซโตไคนินซึ่งเกาะยึดกับ Dowex Resin จะถูกชะล้างออกมาจาก Dowex Resin โดย NH_4OH 5 N 20 มล การชะล้างตามด้วยน้ำกลั่น 20 มล เพื่อทำให้แน่ใจว่าสารคล้ายไซโตไคนินที่ถูกชะล้างออกมาจะไม่ตกค้างอยู่ใน column

จากนั้นล้าง column เพื่อใช้ใหม่ (เพื่อผ่าน water phase ครั้งต่อไป) โดยเติมด้วยกรด HCl (Lab grade) 2 N ปริมาณ 20 มล ปล่อยให้กรดผ่าน column ในอัตรา 2 มล ต่อนาที เมื่อกรดลดระดับลงจนใกล้ผิวหน้าของ Resin ให้เติมน้ำกลั่นทีละ 20 มล จนครบ 100 มล โดยปล่อยให้ไหลในอัตรา 2 มลต่อนาที

4.2 นำสารละลายที่เหลือในข้อ 3 มาทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีการเดียวกับข้อ 4.1

4.3 นำสารละลายที่เก็บได้มารวมกัน จากนั้นนำไปลดปริมาตรด้วยเครื่องระเหยความดันต่ำในสภาพสูญญากาศที่ 600 mm Hg อุณหภูมิ 45 ^{0}ซ ให้ปริมาตรของสารละลายน้อยกว่า 1 มล จากนั้นดูดสารละลาย ที่เหลือด้วย graduate pipette ขนาด 1 มล แล้วล้างสารละลายที่ติดในขวดระเหยด้วย ethanol (Lab grade) 80 % ทีละน้อย แล้วดูดด้วย graduate pipette พยายามล้างสารละลาย ออกจากขวดให้ได้มากที่สุด จนได้ปริมาตร 1 มล เพื่อนำไปทำ paper chromatography ต่อไป

4.4 การทำ paper chromatography (ดัดแปลงจาก ดรุณี , 2539)

เตรียมแผ่น chromatogram โดยใช้กระดาษ Whatman เบอร์ 1 ขนาด 9 x 28 เซนติเมตร ดูดสารละลายในข้อ 4.3 จำนวน 300 ไมโครลิตร (µl) (ซึ่งเทียบเท่าตัวอย่าง 9 กรัมสด) แล้วใช้หลอดแก้วแคปปิลารี่ดูดสารละลายมาstrip เป็นแนวยาวบนกระดาษ chromatogram ห่างจากด้านล่างประมาณ 2 เซนติเมตร แล้วทำให้แห้งโดยใช้เครื่องเป่าผมหลังจากนั้น strip สารละลายซ้ำจนกว่าจะหมดสารตัวอย่าง(ทุกครั้งที่ strip ต้องเป่าให้แห้ง) แล้วนำไปจุ่มใน solvent chamber ที่มีตัวทำละลายซึ่งประกอบด้วย Isopropanol (A.R. grade) 99.7 % : NH_4OH (A.R. grade) 25 % : H_2O (อัตรา 10 : 1 : 1 โดยปริมาตร) ให้แถบสารอยู่เหนือตัวทำละลาย ทิ้งไว้จนสารละลายเคลื่อนที่ไปจนถึงระยะ solvent front ประมาณ 18 เซนติเมตร(วัดจากรอย strip) ใช้เวลาประมาณ 8 ชั่วโมง จากนั้นนำไปผึ่งให้แห้งแล้วแบ่งแผ่น chromatogram เป็น R_f 0.1-1.0 (ซึ่งเป็นส่วนที่อยู่เหนือแถบสารจนถึงระยะ solvent front) โดยแบ่งออกเป็น 10 ส่วนเท่า ๆ กัน(ส่วนละ 18 มม) ส่วน R_f 0.0 จะอยู่ใต้แถบสาร

5. การทำ Soybean Hypocotyl Bioassay (SHB) (ทำในสภาพปลอดเชื้อ) (ดัดแปลงจากโรจน์รวี, 2538)

5.1 นำเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 5 มาคัดเลือกเอาเมล็ดที่ขึ้นราทิ้งไป และนำไปแช่ในน้ำเลือกเฉพาะเมล็ดที่จมน้ำมาใช้ โดยคัดเลือกเมล็ดที่มีขนาดใกล้เคียงกันจำนวน 90 เมล็ด นำมาฆ่าเชื้อโดยใส่ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 250 มล ซึ่งมี ethanol (Lab grade) 75 % แช่เมล็ด เขย่าตลอดเวลา เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปเมล็ดมาแช่ในสารละลาย chlorox (sodium hypocholoride 5.25 % ai.) : น้ำ = 1 : 9 (โดยปริมาตร) เขย่าตลอดเวลา เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 5 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที (ทำในสภาพปลอดเชื้อ)

5.2 เตรียมอาหารวุ้นปริมาตร 500 มล ซึ่งมีส่วนประกอบของน้ำตาล (sucrose) 15 กรัม : วุ้นผงตราเฮลลิคอปเตอร์ (วุ้น 0.8 %) ของห้างหุ้นส่วนจำกัดศรีอิศรา กรุงเทพฯ ประเทศไทย 5 กรัมต่อน้ำกลั่น 500 มล เทใส่หลอดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.4 เซนติเมตร ยาว 15 เซนติเมตร หลอดละ 10 มล ปิดปากหลอดด้วยแผ่นพลาสติก PP (polypropylene) รัดด้วยยางแล้วใช้กระดาษขนาด 7.5 x 7.5 เซนติเมตร ปิดรัดด้วยยางอีกชั้นหนึ่ง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ^{0}ซ และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

5.3 นำเมล็ดถั่วเหลือง ส.จ. 5 ในข้อ 5.1 มาเพาะในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้น (ในสภาพปลอดเชื้อ) แล้วนำไปไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 28 ± 2 ^{0}ซ เป็นเวลา 7 วัน จะได้ hypocotyl ยาวประมาณ 12 เซนติเมตร วัดจากใต้ใบเลี้ยงจนถึงจุดที่เกิดรากเป็นจุดแรก

6. การหาตำแหน่ง R_f ของสารคล้ายไซโตไคนิน (ดัดแปลงจาก ครุณี , 2539)

6.1 เตรียมอาหารวุ้นปริมาณ 2 ลิตร ตามสูตรของ Miller (1961) ส่วนประกอบของอาหารแสดงไว้ในตารางที่ 4 แต่ไม่ใส่ kinetin

6.2 นำแผ่น chromatogram ที่แบ่ง R_f เรียบร้อยแล้วในข้อ 4.4 มาตัดให้ได้ R_f 0.0-1.0 นำ chromatogram แต่ละ R_f มาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ในขวดยาฉีดที่มีปริมาตร 20 มล พร้อมติดป้ายแสดง R_f ไว้ที่ข้างขวด

6.3 เมื่อนำ chromatogram ของแต่ละ R_f ใส่ในขวดยาฉีดเรียบร้อยแล้ว (จะได้ทั้งหมด 165 ขวด) นำอาหารวุ้นที่เตรียมไว้ในข้อ 6.1 เทใส่ในขวดยาฉีดที่ใส่ chromatogram ที่ตัด R_f ใส่ไว้ก่อนแล้ว ขวดละ 10 มล ปิดปากหลอดด้วยพลาสติก PP รัดด้วยยางแล้ว ใช้กระดาษขนาด 7.5 x 7.5 เซนติเมตร ปิดรัดด้วยยางอีกชั้นหนึ่ง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ^{0}ซ และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

6.4 การหาตำแหน่ง R_f ที่มี activity ของสารคล้ายไซโตไคนิน ด้วยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay ทำโดยนำ hypocotyl ออกมาจากหลอดแก้วมาเลี้ยงในอาหารวุ้นที่เตรียมไว้ในข้อ 6.3 โดยเปิดฝาพลาสติกออกในตู้ Laminar air flow แล้วลนปากหลอดที่ตะเกียงแอลกอฮอล์แล้วใช้ปากคีบคีบ hypocotyl ออกมา ตัดใน petridish ที่มีแผ่นพลาสติกรองไว้ โดยใช้ใบมีดเบอร์ 11 ตัดเอาส่วนที่เป็นใบเลี้ยงและส่วนรากทิ้งไป แล้วย้าย hypocotyl ที่ตัดแล้วมาวางลงใน petridish อีกอันที่มีแผ่นพลาสติกรองไว้ แล้วใช้ใบมีดเบอร์ 11 อีกเล่มตัด hypocotyl เป็นชิ้น ๆ ยาวชิ้นละ 1 มิลลิเมตร ใช้ปากคีบคีบ hypocotyl ที่ตัดแล้วใส่ลงในขวดอาหารที่มีแผ่น chromatogram ขวดละ 8 ชิ้น วางห่างกัน 0.3 - 0.4 มิลลิเมตร โดยเลือก hypocotyl ทั้งจากส่วนที่ใกล้กับบริเวณใบเลี้ยงหรือส่วนที่ใกล้กับบริเวณรากให้เฉลี่ยกันไปในแต่ละขวดเพื่อจะเป็นการลดความแปรปรวน (covariance , C.V.)ของการทดลอง ลนปากขวดที่ตะเกียง แอลกอฮอล์ก่อนแล้วปิดปากขวดด้วยแผ่นพลาสติก PP รัดด้วยยาง

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยง hypocotyl สูตร Miller (1961)

สารเคมี	ความเข้มข้น (ส่วนต่อล้าน)
KH_2PO_4	300
KNO_3	1,000
NH_4NO_3	1,000
$Cu(NO_3)_2.3H_2O$	0.35
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	500
$MgSO_4.H_2O$	71.5
KCl	65.0
$MnSO_4.H_2O$	14.0
$(NH_4)_6.Mo_7O_2.4H_2O$	0.1
KI	0.75
$ZnSO_4.7H_2O$	3.80
H_3BO_3	1.60
Myoinositol	100
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine.HCl	0.2
Thiamine.HCl	0.2
Na_2EDTA	13.4
$FeSO_4.7H_2O$	9.9
Sucrose	30,000
Bacto agar	10,000
Naphthalene acetic acid	2.0
Kinetin	0.5

6.5 นำไปบ่มในตู้ควบคุมการเจริญเติบโต อุณหภูมิ 28 ± 2 °ซ ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสงประมาณ 40 วัตต์ / ตารางเมตร เป็นเวลา 13 วัน แล้วจึงนำออกมาชั่งน้ำหนักสดของ hypocotyl แต่ละขวด

7. การทำกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายไคเนติน ความเข้มข้น 5×10^{-1}, 5×10^{-2}, 5×10^{-3}, 5×10^{-4} และ 5×10^{-5} มก / ล ใส่ลงในอาหารวุ้นดัดแปลงจากสูตร Miller (1961) แล้วปิดปากหลอดด้วยพลาสติก PP รัดด้วยยางแล้วใช้กระดาษขนาด 7.5 x 7.5 เซนติเมตร ปิดแล้วรัดด้วยยางอีกชั้นหนึ่ง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาทีแล้วเลี้ยง hypocotyl ตามวิธีการในข้อ 6.4 และ 6.5

8. การคำนวณหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน

จากสมการเส้นตรง $Y = a + b(X)$ ที่คำนวณได้จาก linear regression analysis ของ standard curve

โดยที่ Y = ความเข้มข้นของ kinetin (มก / ล)

X = น้ำหนักสดของ hypocotyl (มก)

ค่า Y ทำให้ทราบว่า ในสารละลาย 1,000 มล มีปริมาณ kinetin อยู่ Y มก

เพราะฉะนั้นในอาหารวุ้น 10 มล มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน Y x 10 / 1000 มก

จากน้ำหนักตัวอย่าง 9 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน Y x 10 / 1000 มก

การเปลี่ยนหน่วยของสารคล้ายไซโตไคนินจาก มก เป็น µg ทำโดยการคูณด้วย 1000

จาก น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน Y / 900 มก

ดังนั้น น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน Y x 1000 / 900 µg

เพราะฉะนั้น น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน Y x 10 / 9 µg

การบันทึกผล

1. เมื่อเลี้ยง hypocotyl ไว้นาน 13 วัน บันทึกน้ำหนักสดของ hypocotyl มีหน่วยเป็น กรัม ต่อ hypocotyl 8 ชิ้น
2. คำนวณหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินจากกราฟมาตรฐานมีหน่วยเป็น µg kinetin equivalent / g f. wt.
3. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$) โดยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % , C.V., linear regression และ correlation

การทดลองที่ 2 อิทธิพลของชนิด Dowex Cation Resin ที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินของยอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้าในช่วงก่อนแตกใบอ่อน 1 สัปดาห์ โดยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay

วัตถุประสงค์ เพื่อเปรียบเทียบชนิดของ Dowex Cation Resin ที่ต่างกันต่อปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ สุ่มสมบูรณ์ มี 3 วิธีการ ใช้ชนิด Dowex Cation Resin คือ Dowex 50 W Cation Resin 8 x 100 (ขนาด 50-100 mesh) (Lab grade) ของ Sigma Chemical Company MO U.S.A. , Dowex Cation Resin Mix ที่ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องกรองน้ำของบริษัทลานาลิติควอเตอร์ เวอร์ค หจก เชียงใหม่ ประเทศไทย แล้วทุบให้ละเอียดแล้วร่อนด้วยตะแกรงขนาด 50 mesh และ Dowex Cation Resin Mix ที่ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องกรองน้ำของบริษัทลานาลิติควอเตอร์ เวอร์ค หจก เชียงใหม่ ประเทศไทย โดยไม่ทุบ เป็นวิธีการ ทำ 15 ซ้ำ โดย 1 หน่วยการทดลองคือ hypocotyl 8 ชิ้น ยาวชิ้นละ 1 มิลลิเมตร (ดัดแปลงจาก ชัยวัฒน์, 2542)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง(ดัดแปลงจาก ดรุณี, 2539) โดยตัดยอด มะปรางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (วัดที่โคนกิ่ง)ประมาณ 0.3-0.4 เซนติเมตร ยาวประมาณ 10 เซนติเมตรวัดจากปลายยอดลงมา จำนวน 30 ยอด (ตัดใบทิ้งให้หมด) แล้วเก็บใส่ถุงพลาสติกนำไปแช่น้ำแข็งในกระติกน้ำแข็ง

2. การสกัด การแยกส่วน ทำเหมือนการทดลองที่ 1

3. การทำให้บริสุทธิ์ ทำเหมือนการทดลองที่ 1 แต่การบรรจุสาร Dowex ใน column จะมี 3 column โดยจะบรรจุ Dowex 50 W Cation Resin 8 x 100 (ขนาด 50-100 mesh) (Lab grade) , Dowex Cation Resin ที่ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องกรองน้ำ แล้วโดนทุบให้ละเอียดร่อนผ่านตะแกรงขนาด 50 mesh และ Dowex Cation Resin Mix ที่ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องกรองน้ำ ลงในแต่ละ column ตามลำดับ โดยการเทผ่านกรวยกรองลงใน column ที่บรรจุน้ำให้ Dowex Cation Resin สูงประมาณ 20 เซนติเมตร แล้วทำการผ่านสารเหมือนการทดลองที่ 1 แต่การ strip สารลงบนแผ่น chromatogram โดย strip แผ่นละ 100 µl (ซึ่งเทียบเท่าตัวอย่างกรัมสด 3 กรัมสด)

3. การหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน (ดัดแปลงจาก โรจน์รวี, 2538)

3.1 เตรียมอาหารวุ้นปริมาตร 8 ลิตร ตามสูตรของ Miller (1961) ส่วนประกอบของอาหารแสดงไว้ในตารางที่ 4 แต่ไม่ใส่ kinetin

3.2 นำแผ่น chromatogram ที่แบ่ง R_f เรียบร้อยแล้วในข้อ 4.4 ของการทดลองที่ 1 มาตัดให้ได้ R_f 0.0-1.0 นำ chromatogram แต่ละ R_f มาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ในขวดยาฉีดที่มีปริมาตร 20 มล พร้อมติดป้าย แสดง R_f ไว้ที่ข้างขวด

3.3 เมื่อนำ chromatogram ของแต่ละ R_f ใส่ในขวดยาฉีดเรียบร้อยแล้ว (จะได้ทั้งหมด 165 ขวด) นำอาหารวุ้นที่เตรียมไว้ในข้อ 6.1 ของการทดลองที่ 1 เทใส่ในขวดยาฉีดที่ใส่ chromatogram ที่ตัด R_f ใส่ไว้ ก่อนแล้ว ขวดละ 10 มล ปิดปากหลอดด้วยพลาสติก PP รัดด้วยยางแล้ว ใช้กระดาษขนาด 7.5 x 7.5 เซนติเมตร ปิดรัดด้วยยางอีกชั้นหนึ่ง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

3.4 การหาตำแหน่ง R_f ที่มี activity ของสารคล้ายไซโตไคนิน ด้วยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay เหมือนการทดลองที่ 1 ข้อ 6.4 และ 6.5

4. การทำกราฟมาตรฐาน เหมือนการทดลองที่ 1 ข้อ 7

5. การคำนวณหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน

จากสมการเส้นตรง $Y = a + b(X)$ ที่คำนวณได้จาก linear regression analysis ของ standard curve

โดยที่ Y = ความเข้มข้นของ kinetin (มก / ล)

X = น้ำหนักสดของ hypocotyl (มก)

ค่า Y ทำให้ทราบว่า ในสารละลาย 1,000 มล มีปริมาณ kinetin อยู่ Y มก

เพราะฉะนั้นในอาหารวุ้น 10 มล มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน $Y \times 10 / 1000$ มก

จากน้ำหนักตัวอย่าง 9 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน $Y \times 10 / 1000$ มก

การเปลี่ยนหน่วยของสารคล้ายไซโตไคนินจาก มก เป็น μg ทำโดยการคูณด้วย 1000

จาก น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน $Y / 900$ มก

ดังนั้น น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน $Y \times 1000 / 900$ μg

เพราะฉะนั้น น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน $Y \times 10 / 9$ μg

การบันทึกผล

1. เมื่อเลี้ยง hypocotyl ไว้นาน 13 วัน บันทึกน้ำหนักสดของ hypocotyl มีหน่วยเป็น กรัม ต่อ hypocotyl 8 ชิ้น
2. คำนวณหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินจากกราฟมาตรฐานมีหน่วยเป็น μg kinetin equivalent / g f. wt.
3. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$) โดยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % , C.V. , linear regression และ correlation

การทดลองที่ 3 การศึกษาอิทธิพลของระยะเวลาในการเก็บรักษายอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้าในช่วงก่อนแตกใบอ่อน 1 สัปดาห์ที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน โดยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay

วัตถุประสงค์ เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินที่ได้จากวิเคราะห์โดยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay หลังจากใช้ระยะเวลาในการเก็บรักษายอดมะปรางที่ต่างกัน

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ สุ่มสมบูรณ์ มี 4 วิธีการ ระยะเวลาในการเก็บรักษาตัวอย่างพืช คือ ยอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้าที่อุณหภูมิ –20 ^{0}ซ ก่อนนำมาวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน คือ 1 เดือน, 2 เดือน, 3 เดือน และ 4 ชั่วโมง หลังจากเก็บตัวอย่างโดยไม่แช่เย็นที่อุณหภูมิ – 20 ^{0}ซ ทำ 15 ซ้ำ โดย 1 หน่วยการทดลองคือ hypocotyl 8 ชิ้น ยาวชิ้นละ 1 มิลลิเมตร (ดัดแปลงจาก ชัยวัฒน์, 2542)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง(ดัดแปลงจาก ดรุณี, 2539) โดยตัดยอด มะปรางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (วัดที่โคนกิ่ง)ประมาณ 0.3-0.4 เซนติเมตร ยาวประมาณ 10 เซนติเมตร จำนวน 30 ยอด (ตัดใบทิ้งให้หมด) แล้วเก็บใส่ถุงพลาสติกนำไปแช่น้ำแข็งในกระติกน้ำแข็ง จากนั้นนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{0}ซ เป็นเวลา 1, 2, 3 เดือน และ 4 ชั่วโมงหลังจากเก็บตัวอย่างโดยไม่แช่เย็นที่อุณหภูมิ – 20 ^{0}ซ เพื่อรอการนำมาสกัด

2. การสกัด การแยกส่วน และการทำให้บริสุทธิ์ ทำเหมือนการทดลองที่ 1 แต่การ strip สารลงบนแผ่น chromatogram โดย strip แผ่นละ 100 µl เทียบเท่าตัวอย่างกรัมสด 3 กรัมสด

3. การหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน (ดัดแปลงจาก โรจน์รวี, 2538)

3.1 เตรียมอาหารวุ้นปริมาตร 4 ลิตร ตามสูตรของ Miller (1961) ส่วนประกอบของอาหาร ตามตารางที่ 4 แต่ไม่ใส่ kinetin

3.2 นำแผ่น chromatogram ที่แบ่ง R_f เรียบร้อยแล้ว เอาเฉพาะ R_f 0.1 , 0.4 – 0.9 ซึ่งเป็น R_f ที่พบ activity ของไซโตไคนินในยอดมะปราง (ในช่วงที่สอดคล้องกับสมการเส้นตรงจากผลการทดลองที่ 1, Y = -0.048410 + 0.0011769 X) มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในขวดยาฉีดที่มีปริมาตร 20 มล พร้อมติดป้ายแสดง treatments ไว้ที่ข้างขวด

3.3 เมื่อนำ chromatogram ของแต่ละ treatment ใส่ในขวดยาฉีดเรียบร้อยแล้ว นำอาหารวุ้นที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1 เทใส่ในขวดยาฉีดที่ใส่ chromatogram ที่ตัด R_f ใส่ไว้ก่อนแล้ว ขวดละ 10 มล ปิดปากหลอดด้วยพลาสติก PP รัดด้วยยาง ใช้กระดาษขนาด 7.5 x 7.5 เซนติเมตร ปิดแล้วรัด

ด้วยยางอีกชั้นหนึ่ง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

3.4 นำมาหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน ด้วยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay เหมือนการทดลองที่ 1 ข้อ 6.4 และ 6.5

4. การทำกราฟมาตรฐาน เหมือนการทดลองที่ 1 ข้อ 7

5. การคำนวณหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน

จากสมการเส้นตรง $Y = a + b(X)$ ที่คำนวณได้จาก linear regession analysis ของ standard curve

โดยที่ Y = ความเข้มข้นของ kinetin (มก / ล)

X = น้ำหนักสดของ hypocotyl (มก)

ค่า Y ทำให้ทราบว่า ในสารละลาย 1,000 มล มีปริมาณ kinetin อยู่ Y มก

เพราะฉะนั้นในอาหารวุ้น 10 มล มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน $Y \times 10 / 1000$ มก

จากน้ำหนักตัวอย่าง 3 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน $Y \times 10 / 1000$ มก

การเปลี่ยนหน่วยของสารคล้ายไซโตไคนินจาก มก เป็น μg ทำโดยการคูณด้วย 1000

จาก น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน $Y / 300$ มก

ดังนั้น น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน $Y \times 1000 / 300$ μg

เพราะฉะนั้น น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน $Y \times 10 / 3$ μg

การบันทึกผล

1. เมื่อเลี้ยง hypocotyl ไว้นาน 13 วัน บันทึกน้ำหนักสดของ hypocotyl มีหน่วยเป็น กรัม ต่อ hypocotyl 8 ชิ้น
2. คำนวณหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินจากกราฟมาตรฐานมีหน่วยเป็น μg kinetin equivalent / g f. wt.
3. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$) โดยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % , C.V. , linear regression และ correlation

การทดลองที่ 4 อิทธิพลของขนาดน้ำหนักสดที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินของยอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้าในช่วงก่อนแตกใบอ่อน 1 สัปดาห์ โดยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay

วัตถุประสงค์ เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินที่ได้จากการวิเคราะห์เมื่อใช้ขนาดน้ำหนักสดที่ต่างกัน

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ สุ่มสมบูรณ์ มี 3 วิธีการ ใช้ขนาดน้ำหนักพืช คือ ขนาดน้ำหนักสด 10 , 20 และ 30 กรัมสด เป็นวิธีการ ทำ 15 ซ้ำ โดย 1 หน่วยการทดลองคือ hypocotyl 8 ชิ้น ยาวชิ้นละ 1 มิลลิเมตร (ดัดแปลงจาก ชัยวัฒน์, 2542)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง(ดัดแปลงจาก ครุณี, 2539) โดยตัดยอด มะปรางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (วัดที่โคนกิ่ง)ประมาณ 0.3-0.4 เซนติเมตร ยาวประมาณ 10 เซนติเมตร จำนวน 40 , 30 และ 20 ยอด (ตัดใบทิ้งให้หมด) แล้วเก็บใส่ถุงพลาสติกนำไปแช่น้ำแข็งในกระติกน้ำแข็ง

2. การสกัด การแยกส่วน และการทำให้บริสุทธิ์ ทำเหมือนการทดลองที่ 1 แต่การ strip สารลงบนแผ่น chromatogram โดย strip แผ่นละ 100 µl เทียบเท่าตัวอย่างกรัมสด 1 , 2 และ 3 กรัมสด ตามลำดับ

3. การหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน (ดัดแปลงจาก โรจน์รวี, 2538)

3.1 เตรียมอาหารวุ้นปริมาตร 3 ลิตร ตามสูตรของ Miller (1961) ส่วนประกอบของอาหาร ตามตารางที่ 4 แต่ไม่ใส่ kinetin

3.2 นำแผ่น chromatogram ที่แบ่ง R_f เรียบร้อยแล้ว เอาเฉพาะ R_f 0.1 , 0.4 – 0.9 ซึ่งเป็น R_f ที่พบ activity ของไซโตไคนินในยอดมะปราง (ในช่วงที่สอดคล้องกับสมการเส้นตรงจากผลการทดลองที่ 1, $Y = -0.048410 + 0.0011769\ X$) มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในขวดยาฉีดที่มีปริมาตร 20 มล พร้อมติดป้ายแสดง treatments ไว้ที่ข้างขวด

3.3 เมื่อนำ chromatogram ของแต่ละ treatment ใส่ในขวดยาฉีดเรียบร้อยแล้ว นำอาหารวุ้นที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1 เทใส่ในขวดยาฉีดที่ใส่ chromatogram ที่ตัด R_f ใส่ไว้ก่อนแล้ว ขวดละ 10 มล ปิดปากหลอดด้วยพลาสติก PP รัดด้วยยาง ใช้กระดาษขนาด 7.5 x 7.5 เซนติเมตร ปิดแล้วรัดด้วยยางอีกชั้นหนึ่ง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

3.4 นำมาหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน ด้วยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay เหมือนการทดลองที่ 1 ข้อ 6.4 และ 6.5

4. การทำกราฟมาตรฐาน เหมือนการทดลองที่ 1 ข้อ 7

5. การคำนวณหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน

จากสมการเส้นตรง $Y = a + b(X)$ ที่คำนวณได้จาก linear regression analysis ของ standard curve

โดยที่ Y = ความเข้มข้นของ kinetin (มก / ล)

X = น้ำหนักสดของ hypocotyl (มก)

ค่า Y ทำให้ทราบว่า ในสารละลาย 1,000 มล มีปริมาณ kinetin อยู่ Y มก

เพราะฉะนั้นในอาหารวุ้น 10 มล มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน $Y \times 10 / 1000$ มก

จากน้ำหนักตัวอย่าง 3 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน $Y \times 10 / 1000$ มก

การเปลี่ยนหน่วยของสารคล้ายไซโตไคนินจาก มก เป็น μg ทำโดยการคูณด้วย 1000

จาก น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน $Y / 300$ มก

ดังนั้น น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน $Y \times 1000 / 300$ μg

เพราะฉะนั้น น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน $Y \times 10 / 3$ μg

การบันทึกผล

1. เมื่อเลี้ยง hypocotyl ไว้นาน 13 วัน บันทึกน้ำหนักสดของ hypocotyl มีหน่วยเป็น กรัม ต่อ hypocotyl 8 ชิ้น
2. คำนวณหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินจากกราฟมาตรฐานมีหน่วยเป็น μg kinetin equivalent / g f. wt.
3. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$) โดยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % , C.V. , linear regression และ correlation

การทดลองที่ 5 อิทธิพลของความยาวยอดที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน ของยอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้าในช่วงก่อนแตกใบอ่อน 1 สัปดาห์ โดยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay

วัตถุประสงค์ เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินที่ได้จากการวิเคราะห์เมื่อใช้ขนาดความยาวที่ต่างกัน

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ สุ่มสมบูรณ์ มี 3 วิธีการ ใช้ความยาวยอด คือ ขนาดความยาว 6 , 8 และ 10 เซนติเมตร เป็นวิธีการ ทำ 15 ซ้ำ โดย 1 หน่วยการทดลองคือ hypocotyl 8 ชิ้น ยาวชิ้นละ 1 มิลลิเมตร (ดัดแปลงจาก ชัยวัฒน์, 2542)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง(ดัดแปลงจาก ดรุณี, 2539) โดยตัดยอด มะปรางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (วัดที่โคนกิ่ง)ประมาณ 0.3-0.4 เซนติเมตร ยาวประมาณ 6 , 8 และ 10 เซนติเมตร จำนวน 80 , 60 และ 40 ยอด (ตัดใบทิ้งให้หมด) ตามลำดับ แล้วเก็บใส่ถุงพลาสติกนำไปแช่น้ำแข็งในกระติกน้ำแข็ง

2. การสกัด การแยกส่วน และการทำให้บริสุทธิ์ ทำเหมือนการทดลองที่ 1 แต่การ strip สารลงบนแผ่น chromatogram โดย strip แผ่นละ 100 µl เทียบเท่าตัวอย่างกรัมสด 3 กรัมสด

3. การหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน (ดัดแปลงจาก โรจน์รวี, 2538)

3.1 เตรียมอาหารวุ้นปริมาตร 3 ลิตร ตามสูตรของ Miller (1961) ส่วนประกอบของอาหาร ตามตารางที่ 4 แต่ไม่ใส่ kinetin

3.2 นำแผ่น chromatogram ที่แบ่ง R_f เรียบร้อยแล้ว เอาเฉพาะ R_f 0.1 , 0.4 – 0.9 ซึ่งเป็น R_f ที่พบ activity ของไซโตไคนินในยอดมะปราง (ในช่วงที่สอดคล้องกับสมการเส้นตรงจากผลการทดลองที่ 1, $Y = -0.048410 + 0.0011769\ X$) มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในขวดยาฉีดที่มีปริมาตร 20 มล พร้อม ติดป้ายแสดง treatments ไว้ที่ข้างขวด

3.3 เมื่อนำ chromatogram ของแต่ละ treatment ใส่ในขวดยาฉีดเรียบร้อยแล้ว นำอาหารวุ้นที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1 เทใส่ในขวดยาฉีดที่ใส่ chromatogram ที่ตัด R_f ใส่ไว้ก่อนแล้ว ขวดละ 10 มล ปิดปากหลอดด้วยพลาสติก PP รัดด้วยยาง ใช้กระดาษขนาด 7.5 x 7.5 เซนติเมตร ปิดแล้วรัดด้วยยางอีกชั้นหนึ่ง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

3.4 นำมาหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน ด้วยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay เหมือนการทดลองที่ 1 ข้อ 6.4 และ 6.5

4. การทำกราฟมาตรฐาน เหมือนการทดลองที่ 1 ข้อ 7

5. การคำนวณหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน

จากสมการเส้นตรง $Y = a + b(X)$ ที่คำนวณได้จาก linear regression analysis ของ standard curve

โดยที่ Y = ความเข้มข้นของ kinetin (มก / ล)

X = น้ำหนักสดของ hypocotyl (มก)

ค่า Y ทำให้ทราบว่า ในสารละลาย 1,000 มล มีปริมาณ kinetin อยู่ Y มก

เพราะฉะนั้นในอาหารวุ้น 10 มล มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน $Y \times 10 / 1000$ มก

จากน้ำหนักตัวอย่าง 3 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน $Y \times 10 / 1000$ มก

การเปลี่ยนหน่วยของสารคล้ายไซโตไคนินจาก มก เป็น μg ทำโดยการคูณด้วย 1000

จาก น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน $Y / 300$ มก

ดังนั้น น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน $Y \times 1000 / 300$ μg

เพราะฉะนั้น น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน $Y \times 10 / 3$ μg

การบันทึกผล

1. เมื่อเลี้ยง hypocotyl ไว้นาน 13 วัน บันทึกน้ำหนักสดของ hypocotyl มีหน่วยเป็น กรัม ต่อ hypocotyl 8 ชิ้น
2. คำนวณหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินจากกราฟมาตรฐานมีหน่วยเป็น μg kinetin equivalent / g f. wt.
3. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$) โดยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % , C.V. , linear regression และ correlation

การทดลองที่ 6 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินในช่วงก่อนการแตกใบอ่อนของยอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้า โดยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay

วัตถุประสงค์ เพื่อให้ทราบการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินในช่วงระยะเวลาที่ต่างกันก่อนการแตกใบอ่อน

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ สุ่มสมบูรณ์ มี 5 วิธีการ ใช้จำนวนสัปดาห์ก่อนการแตกใบอ่อน 0 , 1 , 2 , 3 และ 4 สัปดาห์ เป็นวิธีการ(treatment) ทำ 15 ซ้ำ โดย 1 หน่วยการทดลองคือ hypocotyl 8 ชิ้น ยาวชิ้นละ 1 มิลลิเมตร (ดัดแปลงจาก ชัยวัฒน์, 2542)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง(ดัดแปลงจาก ครุณี, 2539) เริ่มเก็บตัวอย่างวันที่ 19 กรกฎาคม พ.ศ. 2540 และเก็บทุก 7 วัน เก็บตัวอย่างวันสุดท้าย วันที่ 16 สิงหาคม พ.ศ. 2540 โดยตัดยอดมะปรางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (วัดที่โคนกิ่ง)ประมาณ 0.3-0.4 เซนติเมตร ยาวประมาณ 10 เซนติเมตร ต้นละ 30 ยอด (ตัดใบทิ้งให้หมด) แล้วเก็บใส่ถุงพลาสติกนำไปแช่น้ำแข็งในกระติกน้ำแข็ง จากนั้นนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{0}ซ เพื่อรอการนำมาสกัด

2. การสกัด การแยกส่วน และการทำให้บริสุทธิ์ ทำเหมือนการทดลองที่ 1 แต่การ strip สารลงบนแผ่น chromatogram โดย strip แผ่นละ 100 µl (ซึ่งเทียบเท่าตัวอย่างกรัมสด 3 กรัมสด)

3. การหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน (ดัดแปลงจาก โรจน์รวี, 2538)

3.1 เตรียมอาหารวุ้นปริมาตร 4 ลิตร ตามสูตรของ Miller (1961) ส่วนประกอบของอาหาร ตามตารางที่ 4 แต่ไม่ใส่ kinetin

3.2 นำแผ่น chromatogram ที่แบ่ง R_f เรียบร้อยแล้ว เอาเฉพาะ R_f 0.1 , 0.4 – 0.9 ซึ่งเป็น R_f ที่พบ activity ของไซโตไคนินในยอดมะปราง (ในช่วงที่สอดคล้องกับสมการเส้นตรงจากผลการทดลองที่ 1, Y = -0.048410 + 0.0011769 X) มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในขวดยาฉีดที่มีปริมาตร 20 มล พร้อม ติดป้ายแสดง treatments ไว้ที่ข้างขวด

3.3 เมื่อนำ chromatogram ของแต่ละ treatment ใส่ในขวดยาฉีดเรียบร้อยแล้ว นำอาหารวุ้นที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1 เทใส่ในขวดยาฉีดที่ใส่ chromatogram ที่ตัด R_f ใส่ไว้ก่อนแล้ว ขวดละ 10 มล ปิดปากหลอดด้วยพลาสติก PP รัดด้วยยาง ใช้กระดาษขนาด 7.5 x 7.5 เซนติเมตร ปิดแล้วรัดด้วยยางอีกชั้นหนึ่ง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ^{0}ซ และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

3.4 นำมาหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน ด้วยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay เหมือนการทดลองที่ 1 ข้อ 6.4 และ 6.5

4. การทำกราฟมาตรฐาน เหมือนการทดลองที่ 1 ข้อ 7

5. การคำนวณหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน

จากสมการเส้นตรง $Y = a + b(X)$ ที่คำนวณได้จาก linear regression analysis ของ standard curve

โดยที่ Y = ความเข้มข้นของ kinetin (มก / ล)

X = น้ำหนักสดของ hypocotyl (มก)

ค่า Y ทำให้ทราบว่า ในสารละลาย 1,000 มล มีปริมาณ kinetin อยู่ Y มก

เพราะฉะนั้นในอาหารวุ้น 10 มล มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน $Y \times 10 / 1000$ มก

จากน้ำหนักตัวอย่าง 3 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน $Y \times 10 / 1000$ มก

การเปลี่ยนหน่วยของสารคล้ายไซโตไคนินจาก มก เป็น μg ทำโดยการคูณด้วย 1000

จาก น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน $Y / 300$ มก

ดังนั้น น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน $Y \times 1000 / 300$ μg

เพราะฉะนั้น น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน $Y \times 10 / 3$ μg

การบันทึกผล

1. เมื่อเลี้ยง hypocotyl ไว้นาน 13 วัน บันทึกน้ำหนักสดของ hypocotyl มีหน่วยเป็น กรัม ต่อ hypocotyl 8 ชิ้น
2. คำนวณหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินจากกราฟมาตรฐานมีหน่วยเป็น μg kinetin equivalent / g f. wt.
3. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$) โดยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % , C.V. , linear regression และ correlation

การทดลองที่ 7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินในช่วงก่อนการออกดอกของยอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้า โดยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay

วัตถุประสงค์ เพื่อให้ทราบการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินในช่วงระยะเวลาที่ต่างกันก่อนการออกดอก

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ สุ่มสมบูรณ์ มี 4 วิธีการ ใช้จำนวนสัปดาห์ก่อนการออกดอก 2 , 4 , 6 และ 8 สัปดาห์ เป็นวิธีการ(treatment) ทำ 15 ซ้ำ โดย 1 หน่วยการทดลองคือ hypocotyl 8 ชิ้น ยาวชิ้นละ 1 มิลลิเมตร (ดัดแปลงจาก ชัยวัฒน์, 2542)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง(ดัดแปลงจาก ครุณี, 2539) จำนวน 4 ครั้ง โดยเริ่มเก็บตัวอย่างครั้งแรกวันที่ 26 กันยายน พ.ศ. 2541 และเก็บทุก 14 วัน เก็บตัวอย่างวันสุดท้าย วันที่ 7 พฤศจิกายน พ.ศ. 2541 โดยตัดยอด มะปรางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (วัดที่โคนกิ่ง)ประมาณ 0.3-0.4 เซนติเมตร ยาวประมาณ 10 เซนติเมตร ต้นละ 30 ยอด (ตัดใบทิ้งให้หมด) แล้วเก็บใส่ถุงพลาสติกนำไปแช่น้ำแข็งในกระติกน้ำแข็ง จากนั้นนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{0}ซ เพื่อรอการนำมาสกัด

2. การสกัด การแยกส่วน และการทำให้บริสุทธิ์ ทำเหมือนการทดลองที่ 1 แต่การ strip สารลงบนแผ่น chromatogram โดย strip แผ่นละ 100 µl เทียบเท่าตัวอย่างกรัมสด 3 กรัมสด

3. การหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน (ดัดแปลงจาก โรจน์รวี, 2538)

3.1 เตรียมอาหารวุ้นปริมาตรตามสูตรของ Miller (1961) ส่วนประกอบของอาหาร ตามตารางที่ 4 แต่ไม่ใส่ kinetin

3.2 นำแผ่น chromatogram ที่แบ่ง R_f เรียบร้อยแล้ว เอาเฉพาะ R_f 0.1 , 0.4 – 0.9 ซึ่งเป็น R_f ที่พบ activity ของไซโตไคนินในยอดมะปราง (ในช่วงที่สอดคล้องกับสมการเส้นตรงจากผลการทดลองที่ 1, Y = -0.048410 + 0.0011769 X) มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในขวดยาฉีดที่มีปริมาตร 20 มล พร้อม ติดป้ายแสดง treatments ไว้ที่ข้างขวด

3.3 เมื่อนำ chromatogram ของแต่ละ treatment ใส่ในขวดยาฉีดเรียบร้อยแล้ว นำอาหารวุ้นที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1 เทใส่ในขวดยาฉีดที่ใส่ chromatogram ที่ตัด R_f ใส่ไว้ก่อนแล้ว ขวดละ 10 มล ปิดปากหลอดด้วยพลาสติก PP รัดด้วยยาง ใช้กระดาษขนาด 7.5 x 7.5 เซนติเมตร ปิดแล้วรัดด้วยยางอีกชั้นหนึ่ง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ^{0}ซ และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

3.4 นำมาหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน ด้วยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay เหมือนการทดลองที่ 1 ข้อ 6.4 และ 6.5

4. การทำกราฟมาตรฐาน เหมือนการทดลองที่ 1 ข้อ 7

5. การทำ microtome section (ดัดแปลงจาก มนัส, 2525)

5.1 การเก็บและการตัดตัวอย่าง นำส่วนปลายยอดมะปรางมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ยาวประมาณ 0.3 - 0.5 เซนติเมตร โดยตัดเอาเฉพาะส่วน apical meristem และ leaf primodia ประมาณ 1 - 2 ใบ เพื่อนำไปทำในขั้นตอนต่อไป

5.2 การฆ่าและคงสภาพเนื้อเยื่อ (killing and fixing) นำชิ้นส่วนในข้อ 5.1 ที่ตัดหรือแยกแล้วไปแช่น้ำยาฆ่าและคงสภาพเซลล์ คือ formalin-acetic acid alcohol (FAA) 70% โดยใช้ ethyl alcohol 70% (lab grade) : glacial acetic acid (lab grade) : formalin (lab grade) อัตรา 18:1:1 ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้ว (vial) โดยใส่น้ำยาให้ท่วมชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืช

5.3 การดูดอากาศออกจากเนื้อเยื่อ นำชิ้นส่วนที่แช่อยู่ใน FAA 70% เข้าเครื่องดูดอากาศ (suction pump) เพื่อดูดอากาศออกจากเนื้อเยื่อ และช่วยให้น้ำยาซึมเข้าไปได้ทั่วถึง โดยใช้ vacuum ที่ 600 mm.Hg นาน 1 ชั่วโมง จนกว่าฟองอากาศจะออกหมด โดยสังเกตได้จากการที่เนื้อเยื่อจมลงก้นขวดและไม่มีฟองอากาศผุดขึ้นมา จากนั้นทิ้งไว้ในสภาพสูญญากาศ 24 ชั่วโมง

5.4 การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) นำชิ้นส่วนพืชแช่ใน tertiary butyl alcohol (TBA) และ ethyl alcohol ที่มีระดับความเข้มข้นแอลกอฮอล์ 5 ระดับ คือ 50, 70, 85, 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 5) แต่ละระดับใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์ ให้ผสมสี erythrosin ลงไปเล็กน้อยเพื่อให้ชิ้นส่วนติดสีมองเห็นได้ชัดเจน

ตารางที่ 5 ระดับความเข้มข้นของส่วนผสมของสารละลายที่ใช้ในการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ

Compositions	Approximate total percentage of alcohol (%)				
	50	**70**	**85**	**95**	**100**
Distilled water (ml)	50	30	15	-	-
95% ethyl alcohol (ml)	40	50	50	45	-
Tertiary butyl alcohol (ml)	10	20	85	55	75
100% ethyl alcohol (ml)	-	.	-	-	25

5.5 การแทนที่แอลกอฮอล์ (infiltration) แช่ชิ้นส่วนที่ดึงน้ำออกแล้วใน TBA 100 % 3 ครั้ง ๆ ละ 12 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในส่วนผสมของ TBA 100 % กับ paraffin oil ในอัตราส่วน 1:1 นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นย้ายชิ้นส่วนของพืชลงในขวดแก้ว (vial) ที่มี paraffin oil เพียงอย่างเดียว นาน 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเอา paraplast แข็ง เข้าตู้อบอุณหภูมิ 60 °ซ ทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง จะได้เป็น paraplast เหลว แล้วนำเนื้อเยื่อใส่ลงไปในขวดแก้วที่มี paraplast เหลว จากนั้นเก็บรักษาไว้ในตู้อบ ณ อุณหภูมิ 60 °ซ เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์

5.6 การฝังเนื้อเยื่อ (embedding) ใน paraplast ใช้กระดาษแข็งหน้ามันพับเป็นกระทง ประมาณ 3 x 4 เซนติเมตร เท paraplast ที่หลอมไว้แล้วที่อุณหภูมิ 60 °ซ มาแล้วไม่ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง ลงไปให้เกือบเต็มกระทง รอให้ส่วนล่างของ paraplast เย็นตัว จึงใช้เข็มปลายแหลมที่ลนไฟจนร้อน จัดปาดผิวหน้าของ paraplast ให้เหลวตลอดเวลา จากนั้นนำชิ้นส่วนพืชที่ผ่านการ infiltrate แล้วในตู้อบ เทใส่กระทง 1 ชิ้น พร้อมกับใช้เข็มปลายแหลมที่ร้อนจัดเรียงชิ้นส่วนพืชให้อยู่แนวที่ต้องการ และเป็นการไล่ฟองอากาศออกจาก paraplast ด้วย แล้วรีบนำ paraplast ไปตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ตามลักษณะของเนื้อเยื่อพืชเพื่อรอการฝังบนแท่นไม้และรอการตัดต่อไป

5.7 การตัดเนื้อเยื่อด้วย rotary microtome [Leitz wetzlar ของบริษัท Scicrope Instrumeni Co. IA, U.S.A.] นำชิ้นส่วนพืชที่ฝังใน paraplast มาแต่งเป็นแท่งสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ แล้วนำไปติดบนแท่งไม้ โดยใช้ paraplast เป็นตัวเชื่อม แล้วนำไปตัดด้วย rotary microtome ให้มีความหนาประมาณ 15 - 20 ไมครอน จะได้แถบ paraplast ribbon ที่มีชิ้นส่วนพืชติดอยู่ ถ้าเป็นชิ้นส่วนพืชที่แข็งให้ตัดผิวหน้าของ paraplast จนถึงเนื้อเยื่อพืช แล้วนำไปแช่น้ำยาที่ทำให้เนื้อเยื่อนิ่ม (softening) ด้วยกรด hydroflourie (AR grade) 50% ประมาณ 3 - 4 สัปดาห์ เพื่อให้น้ำยาซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อจนอ่อนตัว ก่อนตัดนำเนื้อเยื่อไปล้างด้วยน้ำไหลอย่างน้อย 48 ชั่วโมง

5.8 การนำแถบ paraplast ติดบนกระจกสไลด์ (affixation) ใช้ hapt's adhesive 2% โดยเตรียมจากไข่ขาว 2 มล ต่อน้ำกลั่น 98 มล ในปริมาตร 100 มล แล้วหยดน้ำยา 1 - 2 หยด ทาบนกระจกสไลด์โดยใช้พู่กันเกลี่ยบริเวณที่จะติดเนื้อเยื่อ นำแถบ paraplast ribbon ที่ตัดไว้บนเครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer) ปล่อยให้แห้งวางทิ้งไว้ 3 - 4 วัน ก่อนทำการปิดสไลด์

5.9 ปิดสไลด์ด้วย cover slip โดยใช้ Canada balsam หรือ permount เป็น mounting media ไล่ฟองอากาศออกโดยใช้ปลายมีดผ่าตัด ทิ้งไว้ 4 - 5 วัน

5.10 นำสไลด์ที่ได้ไปถ่ายรูปด้วยกล้อง photomicroscope [Olympus รุ่น PM-30 , Olympus optical Co. Ltd. Tokyo, Japan]ใช้ฟิล์มขนาด 35 มิลลิเมตร ขนาดกำลังขยาย 47 เท่า ในการถ่ายภาพแล้วนำภาพที่ได้มาเทียบกับขนาดมาตราส่วนของ stage micrometer ที่ถ่ายด้วยกำลังขยายขนาดเดียว

6. การคำนวณหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน

จากสมการเส้นตรง $Y = a + b(X)$ ที่คำนวณได้จาก linear regression analysis ของ standard curve

โดยที่ Y = ความเข้มข้นของ kinetin (มก / ล)

X = น้ำหนักสดของ hypocotyl (มก)

ค่า Y ทำให้ทราบว่า ในสารละลาย 1,000 มล มีปริมาณ kinetin อยู่ Y มก

เพราะฉะนั้นในอาหารวุ้น 10 มล มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน $Y \times 10 / 1000$ มก

จากน้ำหนักตัวอย่าง 3 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน $Y \times 10 / 1000$ มก

การเปลี่ยนหน่วยของสารคล้ายไซโตไคนินจาก มก เป็น μg ทำโดยการคูณด้วย 1000

จาก น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน $Y / 300$ มก

ดังนั้น น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน $Y \times 1000 / 300$ μg

เพราะฉะนั้น น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน $Y \times 10 / 3$ μg

การบันทึกผล

1. เมื่อเลี้ยง hypocotyl ไว้นาน 13 วัน บันทึกน้ำหนักสดของ hypocotyl มีหน่วยเป็น กรัม ต่อ hypocotyl 8 ชิ้น
2. คำนวณหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินจากกราฟมาตรฐานมีหน่วยเป็น μg kinetin equivalent / g f. wt.
3. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$) โดยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % , C.V. , linear regression และ correlation
4. บันทึกภาพเพื่อตรวจสอบ flower initiation จาก microtome section

สถานที่ทำการวิจัย

1. สวนวังน้ำค้าง อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

เดือน กรกฎาคม 2540 ถึง เมษายน 2542

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University