บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. พืชทดลอง

ใช้ต้นลิ้นจี่พันธุ์จักรพรรดิอายุ 3 ปี ที่ปลูกด้วยกิ่งตอนจากต้นแม่เดียวกันจำนวน 18 ต้น ในกระถางซีเมนต์ทรงกระบอกขนาดความจุ 100 ลิตร ใช้ทรายละเอียดเป็นวัสดุปลูก ให้สารอาหารในรูปของสารละลาย ซึ่งมีองค์ประกอบธาตุอาหาร คือ Mg^{2+}, K^{+}, Ca^{2+}, $H_2PO_4^{-}$, SO_4^{2-}, NO_3^{-} และ NH_4^{+} ความเข้มข้นของธาตุอาหารแต่ละชนิดเท่ากับ 5 meq/l ส่วนธาตุอาหารรองใช้ตามคำแนะนำของ Hoagland and Arnon (1952) โดยปรับรูปของไนโตรเจนที่ผสมในสารละลายแตกต่างกันตามกรรมวิธี คือ รูปของไนเตรท และแอมโมเนียม ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างให้อยู่ในระดับ 6.5 โดยใช้ 1 N NaOH

2. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

2.1 กระถางปลูก เป็นกระถางซีเมนต์ทรงกระบอกขนาดความจุ 100 ลิตร ด้านล่างกระถางปิดสนิท มีรูระบายน้ำด้านล่างต่อกับถังบรรจุสารละลายธาตุอาหารความจุ 10 ลิตร ด้วยสายยาง ฝังกระถางบนเนินดิน รองก้นกระถางด้วยตาข่ายไนล่อนและแผ่นใยหินเพื่อป้องกันทรายไหลและอุดตันรูระบายน้ำ ปิดฝากระถางด้วยกระเบื้องแผ่นเรียบเพื่อป้องกันการรบกวนจากน้ำภายนอกระบบ (ภาพที่ 1)

2.2 เวอร์เนียคาลิปเปอร์

2.3 เครื่องชั่งไฟฟ้า

2.4 กระบอกตวง

2.5 แผ่นเทียบสีมาตรฐาน (The Royal Horticultural Society, London, U.K.)

2.6 ตลับเมตร

2.7 ป้าย และไม้บรรทัด

2.8 ข้อมูลอุตุนิยมวิทยา จากศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางเกษตรในช่วงการดำเนินการทดลอง ระหว่างเดือน กรกฎาคม 2540 - มีนาคม 2541 แสดงให้เห็นถึงอุณหภูมิอากาศสูงสุด ต่ำสุด ค่าเฉลี่ย ความชื้นสัมพัทธ์ และปริมาณน้ำฝน

ภาพที่ 1 กระถางทรายที่ใช้ปลูกลิ้นจี่

วิธีการทดลอง

1. วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design ; CRD) จำนวน 6 ซ้ำๆ ละ 1 ต้น มี 3 กรรมวิธีคือ

ศึกษาผลของรูปแบบของการให้ไนโตรเจน 3 แบบ คือ

แบบที่ 1.ไนโตรเจนในรูปของไนเตรท ตลอดการทดลอง

แบบที่ 2.ไนโตรเจนในรูปของ แอมโมเนียม ตลอดการทดลอง

แบบที่ 3.ไนโตรเจนในรูปของไนเตรทตั้งแต่เริ่มการทดลองจนถึงเวลา 1 เดือนก่อนการออกดอกตามฤดูกาลออกดอกปกติ (กลางเดือนพฤศจิกายน) แล้วเปลี่ยนให้ไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมจนกระทั่งออกดอก (ประมาณปลายเดือนธันวาคม)

เริ่มทำการทดลองหลังจากเก็บเกี่ยวผลผลิตฤดูกาลปี 2540 หรือประมาณต้นเดือนกรกฎาคม 2540 และสิ้นสุดการทดลองประมาณต้นเดือนกุมภาพันธ์ 2541 หรือเมื่อลิ้นจี่ติดผลแล้ว

สถานที่ทำการทดลอง แปลงทดลองไม้ผล ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2. การให้ธาตุอาหารกับต้นลิ้นจี่

ให้ธาตุอาหารพืชในรูปสารละลายโดยรดให้กับต้นลิ้นจี่ทุกวันในช่วงเช้า (9.00 น. ถึง 10.00 น.) ตามแผนการทดลอง และล้างเกลือที่สะสมในวัสดุปลูกด้วยน้ำเปล่า ทุก 30 วัน โดยการให้น้ำไหลผ่านวัสดุปลูกเป็นเวลาประมาณ 30 นาที ทำการจดบันทึกปริมาณสารละลายในแต่ละวัน

3. การบันทึกข้อมูล

3.1 การเจริญเติบโตของต้นลิ้นจี่

3.1.1 ขนาดความสูงของต้น วัดความสูงจากจุดที่กำหนด (ขอบกระถาง) ถึงส่วนที่สูงที่สุดของทรงพุ่ม ใช้หน่วยเป็นเซนติเมตร

3.1.2 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นโดยใช้เวอร์เนียคาลิปเปอร์วัดตรงจุดกำหนดบริเวณโคนต้นตรงเหนือขอบกระถางประมาณ 5 เซนติเมตร และทำเครื่องหมายเพื่อการวัดครั้งต่อไป ใช้หน่วยเป็นเซนติเมตร

3.1.3 ขนาดของทรงพุ่ม วัดจากปลายใบของทรงพุ่มส่วนที่กว้างที่สุดของสองแนวคือแนวทิศตะวันออก - ตะวันตก และแนวทิศเหนือ - ใต้ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยของทั้งสองแนว ใช้หน่วยเป็นเซนติเมตร

ข้อมูลการเจริญเติบโตจะทำการวัดและบันทึกผล เดือนละ 1 ครั้ง จำนวน 8 เดือน เริ่มตั้งแต่เดือน กรกฎาคม 2540 - กุมภาพันธ์ 2541 และนำมาหาค่าเฉลี่ย ในแต่ละแบบของการได้รับไนโตรเจนของแต่ละเดือน และนำมาหาอัตราการเจริญเติบโตตามสูตรที่แนะนำโดย พาวิน (2535) และรายงานตามสูตรของ Shabana *et al.* (1981)

$$R = \frac{(Xt-Xo)\times 100}{Xo}$$

R = การเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ

Xt = ค่าการวัดครั้งหลัง

Xo = ค่าการวัดครั้งก่อน

3.2 การเจริญเติบโตของยอดและใบใหม่

3.2.1 จำนวนครั้งในการผลิยอด ผูกป้ายและเขียนวันที่ยอดที่ผลิใหม่มีความยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร บันทึกผลการแตกยอดโดยจะนับวันที่ตายอดผลิถึงวันที่ใบโตเต็มที่ คือ ตั้งแต่ตาผลิออกมาเห็นเป็นยอดเล็กๆ ยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร หรือยอดที่มีลักษณะสีเขียวและมีใบกำลังกางออก (ภาพที่ 2) กระทั่งใบเปลี่ยนเป็นสีเขียวและโตเต็มที่ (ภาพที่ 3)

3.2.2 ความกว้างของช่อใบที่โตเต็มที่ วัดความกว้างของพุ่มยอดจากปลายใบด้านหนึ่งถึงปลายใบอีกด้านหนึ่ง 2 แนวตั้งฉากกันแล้วนำหาค่าเฉลี่ย ซึ่งจะสุ่มวัดภายในต้นแล้วหาค่าเฉลี่ย

3.2.3 ความยาวยอด ความยาวตั้งแต่รอยต่อของยอดใหม่ถึงปลายยอด ซึ่งจะสุ่มวัดภายในต้นแล้วหาค่าเฉลี่ย

3.2.4 การเปลี่ยนสีของใบ นับจำนวนวันที่มีการเปลี่ยนสีของใบ เป็นสีเขียวอ่อน โดยเทียบแผ่นสีมาตรฐานของ The Royal Horticultural Society , London.

3.3 การออกดอกติดผล

3.3.1 สังเกตและบันทึกวันที่ออกดอก การบานของดอกเพศผู้ ดอกสมบูรณ์เพศ ดอกเพศเมีย และการติดผล

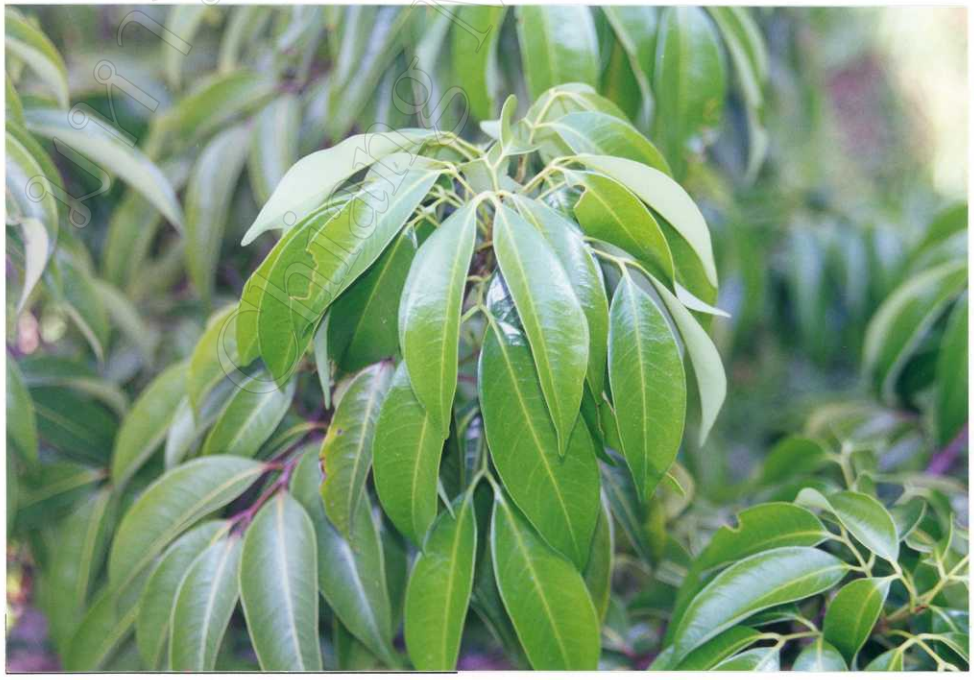
3.3.2 หาเปอร์เซ็นต์ของยอดที่มีการผลิช่อดอกต่อต้น

3.3.3 นับจำนวนช่อดอกต่อยอด และวัดขนาดช่อดอก โดยวัดความยาว ความกว้างของช่อดอก และขนาดของก้านช่อดอกซึ่งจะวัดเส้นผ่าศูนย์กลางก้านช่อดอกเหนือรอยต่อ 2 เซนติเมตร

3.3.4 นับจำนวนดอกเพศผู้ ดอกสมบูรณ์เพศและดอกเพศเมีย (ดอกเพศเมียและดอกสมบูรณ์เพศ นับรวมกัน) แล้วนำมาหาอัตราส่วนเพศดอก

3.3.5 บันทึกการติดผลในแต่ละช่อดอกเมื่อผลมีขนาดเท่าหัวไม้ขีดไฟ แล้วนำมาหาเปอร์เซ็นต์การติดผล

ภาพที่ 2 ยอดลิ้นจี่ที่เริ่มผลิช่อใบใหม่



ภาพที่ 3 ช่อใบที่เปลี่ยนเป็นสีเขียวและเจริญเต็มที่

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหาร และคลอโรฟิลล์ในใบ ในแต่ละช่วงเดือน

3.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารในใบ

<u>การเก็บและเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์</u>

เก็บตัวอย่างใบลิ้นจี่ที่เจริญเต็มที่ เก็บใบที่ 2-4 จากปลายยอด สุ่มเก็บกระจายทั่วต้น ล้างเศษฝุ่นที่ติดมากับใบด้วยน้ำกรอง อบในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 65-70 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง หรือจนตัวอย่างแห้งสนิท พักไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น (desiccator) บดละเอียดด้วยเครื่องบดตัวอย่าง ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 40 mesh บรรจุซองกระดาษเก็บในโถดูดความชื้น อบตัวอย่างไล่ความชื้น แล้วทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นก่อนนำตัวอย่างชั่งเพื่อการวิเคราะห์

<u>การวิเคราะห์ธาตุอาหารในตัวอย่างใบ</u> (เนาวรัตน์, 2527)

3.4.1.1 ปริมาณไนโตรเจนรวม โดยวิธี Micro-Kjeldahl method

1. ใช้ตัวอย่างบดละเอียด 0.2 กรัม ย่อยใน Kjedahl digestion tube ด้วย conc.H_2SO_4 5 มิลลิลิตร ใช้ potassium sulphate-catalyst mixture 1.1 กรัม เป็นตัวเร่ง ใน digestion block เริ่มย่อยด้วยอุณหภูมิต่ำ แล้วค่อยปรับอุณหภูมิสูงขึ้น(~300 องศาเซลเซียส) จนกระทั่งตัวอย่างเปลี่ยนเป็นสีเขียวใส และไม่มีควันของกรด H_2SO_4 ระหว่างที่ย่อย พักตัวอย่างให้เย็น เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2. นำตัวอย่างที่ได้ใส่ flask ล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 3 ครั้ง นำ erlenmeyer flask ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่บรรจุ boric acid indicator 15 มิลลิลิตร รองรับใต้ condenser ของเครื่องกลั่นโดยให้ปลายของ condenser จุ่มลงใน boric acid indicator จากนั้นเปิดให้ NaOH 2 N 20 มิลลิลิตร ไหลลงสู่ flask กลั่นจนกระทั่งปริมาตรของสารละลายใน erlenmeyer flask เพิ่มขึ้นถึง 50 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้จากการกลั่น titrate กับ standard 0.05 N H_2SO_4 จดปริมาตรที่ใช้แล้วนำมาคำนวณหา total nitrogen ด้วยสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ N} = \frac{(\text{ml } H_2SO_4 \text{ sample} - \text{ml } H_2SO_4 \text{ blank}) \times N \times 0.014 \times 100}{\text{wt. of sample}}$$

การทำ Dry ashing

ชั่งตัวอย่างพืช 1.0 กรัม ใส่ใน crucible นำไปเผาในเตาเผา (muffle furnace) ที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ละลายเถ้าด้วย 2 N HCl 5 มิลลิลิตร อุ่นบน hot plate เพื่อช่วยให้เถ้าละลายดีขึ้น ปรับปริมาตร 50 มิลลิลิตร ด้วย น้ำกลั่นแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 5 เก็บสารละลายที่ได้ในตู้เย็นเพื่อวิเคราะห์ธาตุอาหารต่าง ๆ

3.4.1.2 ปริมาณฟอสฟอรัสในใบ ด้วยวิธี dry ashing

สารเคมี

1. mixed reagent
   - A. ammonium vanadate 1.25 กรัม ในน้ำกลั่นอุ่น 200 มิลลิลิตร เติม HNO_3 (sp 1.42) จำนวน 158.42 มิลลิลิตร
   - B. ammonium molybdate tetrahydrate 25 กรัม ในน้ำกลั่นอุ่น 300 มิลลิลิตร
   - ผสม A และ B ปรับปริมาตร 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น
2. standard P 100 ppm
   - ละลาย potassium dihydrogen phosphate 0.4390 กรัม ใน Conc. HNO_3 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

วิธีการ

1. สารละลายตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ใส่ volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติม mixed reagent 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันปรับปริมาตร 25 มิลลิลิตร วัดค่าความเข้มสีที่เกิดขึ้น โดย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร
2. เตรียม standard curve P ความเข้มข้น 0 , 4 , 8 , 12 , 16 และ 20 ppm เติม mixed reagent 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร 25 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที วัดค่าความเข้มสีที่เกิดขึ้น (อ่านเปอร์เซ็นต์ transmittance เขียนกราฟ semi- log อ่านค่า absorbance เขียนกราฟ ธรรมดา) ถ้าตัวอย่างมี P มากกว่า standard ให้ดูดสารละลายตัวอย่างน้อยลง

3.4.1.3 การวิเคราะห์ K โดยวิธี flame photometer absorption

สารเคมี

1. standard K 1000 ppm

KCl 1.9066 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2. standard K 100 ppm

standard K 1000 ppm 10 มิลลิลิตร เติม 0.05 N HCl 40 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร

วิธีการ

สารละลายตัวอย่างจาก dry ashing 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ใน volumetric flask เขย่าให้เข้ากันวัดค่า K ด้วย เครื่อง atomic absorption ในระบบ flame photometer absorption ก่อนอ่านค่าต้องตั้งค่า standard K โดยเตรียม standard set ความเข้มข้น 1, 2 , 3 , 4 และ 5 ppm ถ้าความเข้มข้นตัวอย่างมากกว่า standard ให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นแล้วอ่านใหม่

3.4.1.4 ปริมาณแคลเซียม และแมกนีเซียมในใบ โดย atomic absorption

สารเคมี

1. lanthanum chloride 5 เปอร์เซ็นต์

ละลาย 58.65 กรัม lanthanum oxide ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร เติม 37 เปอร์เซ็นต์ HCl 250 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็น ปรับปริมาตร 1 ลิตร ด้วย น้ำกลั่น

2. lanthanum chloride 0.2 เปอร์เซ็นต์

lanthanum chloride 5 เปอร์เซ็นต์ 40 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร 1 ลิตร

3. standard Ca 1000 ppm

ละลาย $CaCO_3$ 2.525 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เติม conc. HCl 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร 1 ลิตร

4. standard Mg 1000 ppm

ละลาย $MgSO_4.7H_2O$ 10.2708 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตร 1 ลิตร

วิธีการ

ดูดสารละลายที่ได้จาก dry ashing 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร 25 มิลลิลิตร ด้วย lanthanum chloride 0.2 เปอร์เซ็นต์ เขย่าให้เข้ากัน อ่านค่าความเข้มข้นของตัวอย่างด้วยเครื่อง atomic absorption photometer

เตรียม standard set

Ca	1 , 2 , 3 , 4 และ 5 ppm	จาก std. Ca 100 ppm
Mg	0.1 , 0.2 , 0.3 , 0.4 และ 0.5 ppm	จาก std. Mg 10 ppm

ใช้ lanthanum chloride 0.2 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตร

3.4.2 ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บี ตามวิธีการของ Whitham *et al.* (1971)

ใช้ใบสด ที่อยู่ระหว่างข้อที่ 2-4 ของช่อใบอายุประมาณ 60 วัน หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ สุ่มตัวอย่าง 1 กรัม บดกับทรายบริสุทธิ์ในโกร่งบด สกัดด้วยอะซิโตน 80 เปอร์เซ็นต์ 10 มิลลิลิตร กรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ล้างเศษที่ติดโกร่งด้วยอะซิโตน 80 เปอร์เซ็นต์ 2-3 ครั้งจนไม่มีรงควัตถุติดอยู่กับกาก ปรับปริมาตรครั้งสุดท้ายเท่ากับ 20 มิลลิลิตร วัดค่าดูดกลืนแสง (optical density) ด้วย spectrophotometer ที่ช่วงความยาวคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร ใช้อะซิโตน 80 เปอร์เซ็นต์ เป็น blank นำค่าที่ได้คำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ โดยมีหน่วยเป็นมิลลิกรัมของคลอโรฟิลล์ต่อกรัมน้ำหนักสด

$$\text{คลอโรฟิลล์ เอ} = (12.7\, D_{663} - 2.69\, D_{645})\, V / 1000 \times w$$

$$\text{คลอโรฟิลล์ บี} = (12.7\, D_{645} - 2.69\, D_{663})\, V / 1000 \times w$$

โดยที่ D = ค่าดูดกลืนแสง

V = ปริมาตรสารละลายรงควัตถุ

w = น้ำหนักของใบสด

3.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน

วิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินในยอดและรากโดยวิธี soybean hypocotyl bioassay (ดรุณี, 2539)

การเก็บตัวอย่าง

1. ยอด ตัดยอดลิ้นจี่ระยะเพสลาดที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางที่โคนกิ่ง ประมาณ 0.3-0.4 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร จำนวนซ้ำละ 30 ยอด ตัดใบทิ้งทั้งหมด เก็บใส่ถุงพลาสติก แช่น้ำแข็ง จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการสกัด

2. ราก เก็บรากอ่อน ยาวประมาณ 5 เซนติเมตร วัดจากปลายราก โดยประมาณ น้ำหนัก 30 กรัม เก็บใส่ถุงพลาสติกแช่น้ำแข็ง เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์

การสกัด

นำตัวอย่าง บดละเอียดโดยใช้เครื่องปั่น นำมาชั่งน้ำหนัก 30 กรัม ใส่ใน erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติม ethanol 80 เปอร์เซ็นต์ 300 มิลลิลิตร ปิด flask ด้วยพลาสติก รัดยาง และเขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 17 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 โดยใช้ water vacuum flask จะได้สารละลายประมาณ 270 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ลดปริมาตร โดยใช้เครื่องระเหยความดันต่ำ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนเหลือปริมาตรประมาณ 50 มิลลิลิตร ปรับ pH เท่ากับ 2.5 ด้วย HCl 6 N

การแยกส่วน

นำสารละลายที่ได้แยกส่วนด้วยกรวยแยก (separatory funnel) ใช้ ethyl acetate 1.5 มิลลิลิตร ต่อตัวอย่าง 1 กรัม (จากการสกัดใช้ตัวอย่างสด 30 กรัม แช่ใน ethanol 300 มิลลิลิตร กรองได้ 270 มิลลิลิตร เนื่องจากไม่สามารถกรองได้ทั้งหมด จึงเทียบเท่ากับตัวอย่าง 27 กรัม) ดังนั้นใช้ ethyl acetate 40.5 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันตั้งทิ้งไว้ สารละลายจะแยกชั้นเก็บเอาส่วนที่อยู่ชั้นล่างไว้ (water phase) จะได้ประมาณ 50 มิลลิลิตร

การทำบริสุทธิ์

- กำจัดสิ่งเจือปนและสารยับยั้งการเจริญเติบโต (inhibitor) โดยใช้ column chromatography

- นำ water phase ผ่าน column โดยใช้ burette ขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ยาว 25 เซนติเมตร บรรจุ Dowex resin ใน burett สูงประมาณ 20 เซนติเมตร โดยจะต้องแช่ Dowex resin ในน้ำกลั่นให้ขยายตัวเต็มที่ ก่อนจึงบรรจุใน burette ใช้สำลีรองพื้น ล้าง column ด้วย น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นผ่าน water phase ลงใน column 10 มิลลิลิตร ควบคุมให้สารหยดลงช้าๆ ระวังอย่าให้ Dowex resin แห้ง สารละลายที่ไหลออกมาให้ทิ้งไป จากนั้นเก็บสารละลายที่ถูกชะด้วย NH_4OH 5 N 20 มิลลิลิตร ตามด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ปริมาตรประมาณ 40 มิลลิลิตร จากนั้นล้าง column เพื่อ ผ่าน water phase ครั้งต่อไปด้วย HCl 2 N 20 มิลลิลิตร ตามด้วยน้ำกลั่นอย่างน้อย 100 มิลลิลิตร จึงผ่าน water phase ตามขั้นตอนจนหมด จากนั้นนำไปลดปริมาตรด้วยเครื่องระเหยความดันต่ำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เหลือปริมาตร 1 มิลลิลิตร

- การทำ paper chromatography เพื่อหา R_f ที่พบ cytokinin activity (พบที่ R_f 0.1 และ 0.6-0.9 (ดรุณี, 2539))

เตรียมแผ่นโครมาโตแกรมโดยใช้กระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาด 9 x 28 เซนติเมตร ขีดเส้นที่จุดเริ่มต้นที่จะ strip สารละลายด้วยดินสอดำห่างจากขอบล่าง 2 เซนติเมตร และจุดสุดท้ายที่สารละลายจะเคลื่อนที่ไปถึง นำสารละลายตัวอย่างที่ลดปริมาตรแล้วมา strip ลงบนแผ่นโครมาโตแกรม โดยใช้ตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร (เทียบเท่าตัวอย่างสด 4.5 กรัม) จำนวน 3 แผ่น ทิ้งให้แถบสารแห้ง นำแผ่นโครมาโตแกรมแช่ใน mobile phase คือ isopropanol (100 เปอร์เซ็นต์) : NH_4OH (25 เปอร์เซ็นต์) : H_2O = 10 : 1 : 1 (v/v) โดยให้แถบสารอยู่เหนือตัวทำละลาย ทิ้งไว้จนแถบสารละลายเคลื่อนที่ไปถึง solvent front (ใช้เวลาประมาณ 8-9 ชั่วโมง) แล้วนำออกผึ่งให้แห้ง

จากนั้นตัดส่วน R_f 0.1 และ 0.6-0.9 (ดรุณี, 2539) เพื่อเก็บไว้หาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินต่อไป

Bioassay

1. ตัดแผ่นโครมาโตแกรม เฉพาะ R_f 0.1 และ 0.6-0.9 เป็นชิ้นเล็กรวมกันใส่ขวดฉีดยา ขนาด 20 มิลลิลิตร

2. เตรียมอาหารวุ้นสูตร Miller (1961) แต่ไม่เพิ่ม kinetin เทอาหารที่เตรียมใส่ขวดที่ตัดโครมาโตแกรมไว้ก่อนแล้ว ขวดละ 10 มิลลิลิตร ปิดปากขวดด้วยพลาสติก รัดยาง ใช้กระดาษปิดปากขวดอีกชั้นหนึ่ง นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน15 ปอนด์ต่อ ตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที

3. นำต้นถั่วเหลืองที่เพาะในสภาพปลอดเชื้อในที่มืดและมีอายุ 7 วัน ตัดส่วน hypocotyl แต่ละชิ้นยาว 1 มิลลิเมตร วางลงในขวดอาหารที่เตรียมไว้ขวดละ 8 ชิ้น วางแต่ละชิ้นห่างเท่าๆ กัน ปิดปากขวดด้วยพลาสติกตามเดิม (ทำในสภาพปลอดเชื้อ) นำไปเลี้ยงในตู้ควบคุมสภาพแวดล้อม

ที่มีความเข้มแสง 1000 lux อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 วัน นำชิ้นต้นถั่วเหลืองมาชั่งน้ำหนักสด มิลลิกรัม/ 8 ชิ้น เปรียบเทียบกับ standard

การทำ standard curve

เตรียมอาหารวุ้นสูตร Miller (1961) โดยให้มีความเข้มข้นของ kinetin 5×10^{-1}, 5×10^{-2}, 5×10^{-3}, 5×10^{-4} และ 5×10^{-5} มิลลิกรัม/ลิตร ใส่ขวดฉีดยา ขนาด 20 มิลลิลิตร ขวดละ 10 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 15 ขวด ปิดปากขวดด้วยพลาสติกตามด้วยกระดาษ รัดยาง นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ตัดส่วน hypocotyl เลี้ยงในอาหารเช่นเดียวกับขั้นตอนการทำ bioassay

3.6 สัดส่วนน้ำหนักแห้ง

ถอนต้นลิ้นจี่ออกจากกระถางโดยใช้คานไม้ผูกกับลำต้น ยกคานด้วยแม่แรง แยกส่วนของ ราก ลำต้น กิ่ง และใบ อบแห้ง หาสัดส่วนระหว่างน้ำหนักแห้งของ ราก ลำต้นรวมกิ่ง และใบ

3.7 การหาปริมาณการใช้น้ำของต้นลิ้นจี่

3.7.1 เติมสารละลายที่ให้กับต้นลิ้นจี่ในถังพักน้ำจำนวน 10 ลิตรต่อวัน ยกถังน้ำขึ้นบนเนินดินเพื่อให้สารละลายชุ่มทั่ววัสดุปลูก จากนั้นยกถังพักน้ำลงวางบนพื้นราบให้น้ำส่วนเกินไหลลงถังพัก (เครื่องปลูกจะได้รับน้ำที่ระดับ field capacity) ทุกวันทำเช่นเดียวกัน ก่อนเติมน้ำจดบันทึกปริมาตรน้ำที่หายไปในแต่ละวัน

3.7.2 วัดปริมาตรน้ำระเหยในแต่ละวันโดยทำวิธีเดียวกับข้อ 3.7.1 แต่จะวัดในกระถางทรายเปล่า จะได้ปริมาตรน้ำที่ระเหยในแต่ละวัน

ปริมาณการใช้น้ำของต้นลิ้นจี่เท่ากับปริมาตรน้ำที่หายไปในแต่ละวันหักออกด้วยปริมาตรน้ำที่ระเหย แล้วหาค่าเฉลี่ยการใช้น้ำแต่ละวันในแต่ละเดือน

การวิเคราะห์ข้อมูล โดยใช้โปรแกรม Statistix Version 3.5 (SX 3.5) โดยการวิเคราะห์ Analysis of Variance, Coefficient of Variation (C.V.) และ Least Significant Difference (LSD)