

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

1. กระบอกรับน้ำกลั่น
2. โกร่งสำหรับบด
3. กล้องถ่ายรูป และฟิล์ม
4. เขียง มีดหั่น และมีดปอกผลไม้
5. เครื่องแก้วต่างๆ
6. ถาดสเตนเลสขนาด 18 นิ้ว
7. ถังกระดาษสีน้ำตาลสำหรับห่อผล ขนาด 20×30 เซนติเมตร
8. แผ่นป้ายเครื่องหมายพลาสติก
9. แผ่นสะท้อนแสง ขนาด 25×35 เซนติเมตร ทำจากแผ่นพลาสติกหุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์
10. ลำโพง กระดาษกรองเบอร์ 1 และกระดาษทึบ
11. หลอดฟลูออเรสเซนต์
12. หลอดดูดตราไวโอเลต
13. หลอดหยด
14. อะลูมิเนียมฟอยล์
15. Cock borer
16. Micro pipette

3.2 เครื่องมือ

1. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler รุ่น Toledo PG503-S
2. เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge) ยี่ห้อ Hermle รุ่น Z383K
3. เครื่อง Rotamixer ยี่ห้อ Hooke & Tucker, LTD.
4. ตู้เย็น และห้องเย็น
5. Gas chromatograph (GC) ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น GC-9A

6. Hunter's colormeter ยี่ห้อ Minolta รุ่น CR-200
7. UV/VIS spectrophotometer ยี่ห้อ Lambda 25 Spectrometer
8. pH meter ยี่ห้อ Mettler รุ่น Toledo 320
9. Spectrophotometer ยี่ห้อ Miton Roy Company รุ่น Spectronic 21
10. Water bath

3.3 สารเคมี

1. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ใช้ในการทดลอง
 - ABA (abscisic acid)
 - Ethephon (2-chloroethylphosphonic acid)
2. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก
 - Ethyl alcohol (C_2H_5OH)
 - Folin-Ciocalteu's phenol reagent
 - Gallic acid
 - Sodium carbonate (Na_2CO_3)
3. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน
 - Ethyl alcohol (C_2H_5OH)
 - Hydrochloric acid (HCl)

4. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์แอกทิวิตีของฟีนอลอะลานีน แอมโมเนีย-ไลเอส (PAL)
 - Boric acid (H_3BO_3)
 - Bovine Serum Albumin (BSA)
 - Cinnamic acid ($C_9H_8O_2$)
 - Copper sulphate ($CuSO_4 \cdot 5 H_2O$)
 - Folin-Ciocalteu's phenol reagent
 - Mercaptoethanol
 - Perchloric acid ($HClO_4$)
 - Phenylalanine ($C_9H_{11}NO_2$)

- Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)
- Potassium tartrate ($\text{COOK}(\text{CHOH})_2 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$)
- Sodium borate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$)
- Sodium carbonate (Na_2CO_3)
- Sodium hydroxide (NaOH)

5. สารเคมีอื่นที่ใช้ในการทดลอง

- Clorox
- Citric acid
- Detergent
- Sucrose

3.4 พืชทดลอง

มะม่วงพันธุ์มหาชนกจากไร่พัฒน์และบุตร ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่

3.5 วิธีการดำเนินการวิจัย

ทำการคัดเลือกต้นมะม่วงพันธุ์มหาชนกที่สมบูรณ์อายุประมาณ 5 ปี จำนวน 16 ต้น ที่มีทรงพุ่มใกล้เคียงกัน จากนั้นตัดปลายที่ช่อดอกเพื่อให้ทราบอายุของผลที่จะนำมาใช้ในการศึกษา โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design : CRD) และแบ่งการทดลองเป็น 3 การทดลองดังนี้

3.5.1 การทดลองที่ 1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนโทไซยานิน สารประกอบฟีนอลิกและ แอกทิวิตีของฟีนอละลาโนน แอมโมเนีย-ไลเอส (PAL) ในเปลือกผล ระหว่างการเจริญของผล

ในระหว่างที่ผลมีอายุได้ 28 วันหลังจากดอกบาน จนกระทั่งผลบนต้นมีการเจริญเต็มที่ซึ่งมีอายุประมาณ 133 วันหลังจากดอกบาน ทำการเก็บเกี่ยวผลจากต้นดังกล่าวทุก ๆ 7 วัน ครั้งละ 12 ผล (ซ้ำ) รวมผลทั้งหมดประมาณ 192 ผล มาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของเปลือกผลในเรื่องต่อไปนี้ [ทั้งนี้ในระหว่างการทดลองนี้ทำการบันทึกการเปลี่ยนแปลงระดับอุณหภูมิของอากาศ ($^{\circ}\text{C}$)

ความชื้นสัมพัทธ์ (%) และระยะเวลาที่มีแสงอาทิตย์ (hr) ในสวนมะม่วงที่ทำการทดลอง (ภาคผนวก ภาพ 4)]

1. การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ

1.1 น้ำหนักผล

โดยการชั่งน้ำหนักผลด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง

1.2 พื้นที่สีแดงของเปลือกผล

ประเมินพื้นที่สีแดงของเปลือกผล (red blush) ด้วยสายตา โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ที่มี สีแดงปรากฏบนเปลือกผลต่อพื้นที่เปลือกผลทั้งหมด

1.3 พื้นที่สีเหลืองของเปลือกผล

ประเมินพื้นที่สีเหลืองของเปลือกผล (yellow blush) ด้วยสายตา โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ที่มีสีเหลืองปรากฏบนเปลือกผลต่อพื้นที่เปลือกผลทั้งหมด

2. การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด

การสกัดและวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดโดยใช้ estimation of total anthocyanin method ซึ่งเป็นวิธีการของ Ranganna (1977) โดยนำเปลือกผลหนัก 5 กรัม มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่งในขวดรูปชมพู่ที่มีสารละลาย ethanolic HCl ปริมาตร 25 มิลลิลิตร วางที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายที่สกัดได้มากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ทำการปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย ethanolic HCl จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้ ethanolic HCl เป็นตัวเปรียบเทียบ จากนั้นนำค่า absorbance ที่อ่านได้ไปคำนวณเพื่อหาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดมีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด (mg/100 g fresh weight) โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$\text{Total absorbance} = \frac{\text{absorbance at 535 nm} \times \text{final volume} \times 100}{\text{weight (g)}}$$

$$\text{Total anthocyanin} = \frac{\text{total absorbance}}{98.2}$$

3. การเปลี่ยนแปลงแอกทิวิตีของฟีนิลอะลานีน แอมโมเนีย-ไลเอส (PAL)

การสกัดและวิเคราะห์แอกทิวิตีของฟีนิลอะลานีน แอมโมเนีย-ไลเอส (PAL) ดัดแปลงจากวิธีการของ Faragher and Chalmers (1977) และ Arakawa *et al.* (1986) โดยมี 3 ขั้นตอน ดังนี้

3.1 การสกัดเอนไซม์ PAL (extraction of PAL)

ทำการสกัดเอนไซม์ PAL ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยการบดและสกัดเปลือกผลหนัก 5 กรัม ด้วยสารละลายสกัดปริมาตร 20 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย 0.1 M borate buffer (pH 8.8) 14 mM mercaptoethanol และ 2 % polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) แล้วนำสารผสมไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที นำเฉพาะของเหลว (supernatant) ไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาทีอีกครั้ง นาน 30 นาที นำเฉพาะของเหลวซึ่งเป็น crude enzyme ไปใช้ในการวิเคราะห์หาแอกทิวิตีของเอนไซม์ PAL ในขั้นตอนต่อไป

3.2 การวิเคราะห์เอนไซม์ PAL (PAL enzyme assay)

เตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย 40 mM phenylalanine 1 มิลลิลิตร และ 0.1 M borate buffer (pH 7) 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติม crude enzyme ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายดังกล่าว (ชุดเปรียบเทียบเติมน้ำกลั่นแทน crude enzyme) ปริมาตรรวมทั้งหมดเท่ากับ 4 มิลลิลิตร วางหลอดทดลองนี้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 2 N perchloric acid 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองแล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วนำสารผสมนี้ไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นำของเฉพาะเหลว (supernatant) วัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/VIS-spectrophotometer จากนั้นนำค่า absorbance ที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ cinnamic acid (ภาคผนวกภาพ 1)

3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (protein assay)

นำ crude enzyme ที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีการของ Lowry *et al.* (1951) โดยเจือจาง crude enzyme ลง 100 เท่า นำ crude enzyme ที่เจือจางแล้วปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมนลงในหลอดทดลองที่มี alkaline copper solution 2.5 มิลลิลิตร (สารละลายนี้ประกอบด้วย 4 % Na_2CO_3 : 0.2 N NaOH : 1 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 2 % potassium tartrate ในอัตราส่วน 5 : 5 : 0.1 : 0.1) วางสารผสมนี้ไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที จากนั้นเติม 50 % phenol reagent 0.25 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองผสมให้เข้ากันแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำสารละลายผสมที่ได้ไปวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง

spectrophotometer แล้วนำค่า absorbance ที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณโปรตีน โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) (ภาคผนวกภาพ 2) ซึ่งปริมาณโปรตีนที่ได้มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม ต่อ 1 กรัม น้ำหนักสด (mg/g fresh weight) โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$\text{ปริมาณโปรตีน (mg/g fresh weight)} = 0.4 Y$$

เมื่อ $Y =$ ค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

ในการทดลองนี้ นำค่าที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.2 และ 3.3 มาคำนวณหาค่าเอกทิวติของเอนไซม์ PAL ซึ่งมีหน่วยเป็น นาโนโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน•ชั่วโมง (n mole/mg protein•hr)

4. การเปลี่ยนแปลงสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

การสกัดและวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดดัดแปลงจากวิธีการของ Ketsa and Atantee (1998) และ Singleton and Rossi (1965) โดยมี 2 ขั้นตอน ดังนี้

4.1 การสกัดสารประกอบฟีนอลิก

ทำการสกัดสารประกอบฟีนอลิกภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยการบดและสกัดเปลือกผลหนัก 3 กรัม ด้วยสารละลาย 80 % ethanol ปริมาตร 12 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที นำเฉพาะของเหลวซึ่งเป็น crude enzyme ไปใช้ในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดต่อไป

4.2 การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

นำ crude enzyme ที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก โดยเจือจาง crude enzyme ลง 200 เท่า เติมน้ำ crude enzyme ที่เจือจางแล้วปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีสารละลาย 10 % folin-ciocalteu's phenol reagent 10 มิลลิลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 8 นาที จากนั้นเติม 7.5 % Na_2CO_3 8 มิลลิลิตร ลงไปในขวดรูปชมพู่ผสมให้เข้ากัน จากนั้นวางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายผสมที่ได้ไปวัดหาค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer แล้วนำค่า absorbance ที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid (ภาคผนวกภาพ 3) ซึ่งปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ได้มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด (mg/100 g fresh weight) โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg/100 g fresh weight) = 454.55 Y

เมื่อ Y = ค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

5. การเปลี่ยนแปลงอัตราการผลิตเอทิลีนของผล

นำผลบรรจุลงในกล่องพลาสติกแล้วปิดให้สนิทเป็นเวลา 2 ชั่วโมง สุ่มนำก๊าซที่สะสมในกล่องมาวัดอัตราการผลิตเอทิลีนของผลโดยใช้เครื่อง gas chromatograph (GC) ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น GC-9A ที่ใช้ flame ionization detector (FID) โดยสภาวะที่ใช้วิเคราะห์คือ carrier gas ใช้ก๊าซไนโตรเจน ที่มีอัตราการไหลของก๊าซ 60 มิลลิตร/นาที อุณหภูมิของ column oven 60 องศาเซลเซียส และ injector 90 องศาเซลเซียส column ที่ใช้ในการหาปริมาณก๊าซเอทิลีนคือ activated alumina จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาอัตราการผลิตเอทิลีนของผลซึ่งมีหน่วยเป็น ไมโครลิตร/กิโลกรัม ต่อ ชั่วโมง ($\mu\text{l C}_2\text{H}_4/\text{kg}\cdot\text{hr}$) โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$\text{Ethylene production rate } (\mu\text{l C}_2\text{H}_4/\text{kg}\cdot\text{hr}) = \frac{\text{free volume container (l)} \times \text{ppm ethylene measured}}{\text{Sample weight (kg)} \times \text{sealed time (hr)}}$$

$$\begin{aligned} \text{free volume container (l)} &= \text{ปริมาตรของกล่องที่บรรจุ} - \text{ปริมาตรของผลทั้งหมด} \\ \text{ppm ethylene measure} &= \text{ปริมาณเอทิลีนที่วัดได้จากเครื่อง GC (ppm)} \\ \text{sample weight (kg)} &= \text{น้ำหนักของผล (กิโลกรัม)} \\ \text{sealed time (hr)} &= \text{ระยะเวลาที่ปิดกล่อง (ชั่วโมง)} \end{aligned}$$

3.5.2 การทดลองที่ 2 ผลของแสงต่อปริมาณแอนโทไซยานินและแอกทิวิตีของฟีนอละลาโนน แอมโมเนีย-ไลเอส (PAL) ในเปลือกผลระหว่างการเจริญของผล

การทดลองที่ 2 แบ่งการทดลองย่อยออกเป็น 2 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 2.1 ผลของแสงต่อปริมาณแอนโทไซยานินและแอกทิวิตี ของฟีนอละลาโนน แอมโมเนีย-ไลเอส (PAL) ในเปลือกผล ระหว่างการเจริญของผล ในสภาพ *in vivo*

เมื่อผลอายุได้ 70 วันหลังจากดอกบาน คัดเลือกผลที่ไม่มีสีแดงปรากฏหรือมีพื้นที่
สีแดงปรากฏไม่เกิน 5 % จากพื้นที่เปลือกผลทั้งหมด รวมทั้งไม่มีโรคและแมลงรบกวน มาทำการ
ให้ผลดังกล่าวบนต้นได้รับสภาพแสงต่างกัน 3 วิธีการดังนี้

วิธีการที่ 1 ให้ผลได้รับแสงอาทิตย์ในสภาพปกติ (ชุดควบคุม)

วิธีการที่ 2 ให้ผลไม่ได้รับแสง โดยทำการห่อผลด้วยถุงกระดาษ

(ภาพ 3.1)

วิธีการที่ 3 เพิ่มการได้รับแสงอาทิตย์แก่ผลโดยใช้แผ่นสะท้อนแสง

(ภาพ 3.2)

ทั้งนี้ปล่อยให้ผลบนต้นได้รับสภาพแสงดังกล่าวจนกระทั่งผลบนต้นมีการเจริญ
เต็มที่ซึ่งมีอายุประมาณ 133 วันหลังจากดอกบาน (ภาพ 3.3) โดยในระหว่างนี้ทุก 7 วัน ทำการสุ่ม
เก็บตัวอย่างผลจากทั้ง 3 วิธีการ วิธีการละ 12 ผล (ซ้ำ) รวมผลทั้งหมดประมาณ 360 ผล มาวิเคราะห์
การเปลี่ยนแปลงของเปลือกผลเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ในเรื่องต่อไปนี้ [ทั้งนี้ในระหว่างการ
ทดลองนี้ทำการบันทึกการเปลี่ยนแปลงระดับอุณหภูมิอากาศ (°C) ความชื้นสัมพัทธ์ (%) และ
ระยะเวลาที่มีแสงอาทิตย์ (hr) ในสวนมะม่วงที่ทำการทดลอง (ภาคผนวกภาพ 5)]

1. การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ

1.1 น้ำหนักผล

1.2 พื้นที่สีแดงของเปลือกผล

1.3 พื้นที่สีเหลืองของเปลือกผล

2. การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด

3. การเปลี่ยนแปลงแอกทิวิตีของเอนไซม์ PAL



ภาพ 3.1 ถูกระดาษที่ใช้ในการห่อผลไม้ม่วง



ภาพ 3.2 แผ่นสะท้อนแสงที่ใช้ในการสะท้อนแสงแก่ผลไม้ม่วง



ภาพ 3.3 ผลมะม่วงพันธุ์มหาชนกที่ได้รับแสงในสภาพต่างกัน 3 วิธี คือ ได้รับแสงอาทิตย์ในสภาพปกติ ไม่ได้รับแสงโดยการห่อผล และเพิ่มการได้รับแสงอาทิตย์โดยใช้แผ่นสะท้อนแสง

การทดลองที่ 2.2 ผลของแสงต่อปริมาณแอนโทไซยานินและแอกทิวิตีของฟีนอละลาโนน แอมโมเนีย-ไลเอส (PAL) ในเปลือกผลระหว่างการเจริญของผล ในสภาพ *in vitro*

เก็บเกี่ยวผลที่ไม่มีสีแดงปรากฏบนเปลือกผล รวมทั้งไม่มีโรคและแมลงรบกวนที่มีอายุ 80, 90 และ 100 วันหลังจากดอกบาน มาปอกเปลือกแล้วนำเฉพาะเปลือกผลแต่ละอายุมาตัดเจาะให้เป็นชิ้นกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร (ภาพ 3.4) แช่เปลือกผลดังกล่าวลงในสารละลาย 10 % clorox 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง จากนั้นแช่ในสารละลาย 0.01 % citric acid 5 นาที วางชิ้นเปลือกผลดังกล่าวลงในจานแก้วที่มีสารละลาย 5 % sucrose 25 มิลลิลิตร จำนวน 20 ชิ้น/จานแก้ว รวมชิ้นเปลือกผลทั้งหมดประมาณ 2,400 ชิ้น จากนั้นวางจานแก้วที่มีชิ้นเปลือกผลดังกล่าวให้ได้รับสภาพแสงต่างกัน 3 วิธีการดังนี้

- | | |
|--------------|--------------------------------|
| วิธีการที่ 1 | ได้รับแสงฟลูออเรสเซนต์ตลอดเวลา |
| วิธีการที่ 2 | ได้รับแสงอุตราไวโอเลตตลอดเวลา |
| วิธีการที่ 3 | ไม่ได้รับแสงหรือมืดตลอดเวลา |



ภาพ 3.4 ชิ้นเปลือกผลมะม่วงพันธุ์มหาชนกที่ใช้ในการทดลอง

ทั้งนี้วางแผนการทดลองนี้ไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน โดยในวันที่ 0, 5 และ 10 นำตัวอย่างชิ้นเปลือกผลจากทั้ง 3 วิธีการ มาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของชิ้นเปลือกผลในเรื่องต่อไปนี้

1. การเปลี่ยนแปลงสีเปลือก

วัดสีชิ้นเปลือกผลโดยใช้ Hunter's colorimeter ยี่ห้อ Minolta รุ่น CR-200 แต่ละชิ้นของเปลือกผลวัด 1 ครั้ง รวมทำการวัดสี 20 ครั้งต่องานแล้วค่าที่ได้จากการวัดแสดงผลเป็นค่า L^* , a^* และ b^* โดย

ค่า L^* value (The lightness factor value) เป็นค่าที่แสดงความมืดและความสว่างของสี มีค่าตั้งแต่ 0–100 ค่าต่ำแสดงว่ามีความสว่างของสีชิ้นเปลือกผลน้อย ค่าสูงแสดงว่ามีความสว่างของสีชิ้นเปลือกผลมาก

ค่า a^* value (The chromaticity coordinates (hue)) เป็นค่าที่แสดงสีเขียวและสีแดง ถ้ามีค่าเป็นลบแสดงให้เห็นว่าชิ้นเปลือกผลมีสีเขียว และถ้ามีค่าเป็นบวกจะแสดงว่าชิ้นเปลือกผลมีสีแดง โดยค่า a^* มีค่าตั้งแต่ -60 ถึง +60

ค่า b^* value (The chromaticity coordinates (chroma)) เป็นค่าที่แสดงสีเหลืองและสีน้ำเงิน ถ้ามีค่าเป็นลบแสดงให้เห็นว่าชิ้นเปลือกผลมีสีน้ำเงิน และถ้ามีค่าเป็นบวกจะแสดงว่าชิ้นเปลือกผลมีสีเหลือง โดยค่า b^* มีค่าตั้งแต่ -60 ถึง +60

2. การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด
3. การเปลี่ยนแปลงเอกทิวติของเอนไซม์ PAL

3.5.3 การทดลองที่ 3 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชบางชนิดต่อปริมาณแอนโทไซยานินและเอกทิวติของฟีนอละลาโนน แอมโมเนีย-ไลเอส (PAL) ในเปลือกผลระหว่างการเจริญของผล

การทดลองที่ 3 แบ่งการทดลองย่อยออกเป็น 2 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 3.1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชบางชนิดต่อปริมาณแอนโทไซยานินและเอกทิวติของฟีนอละลาโนน แอมโมเนีย-ไลเอส (PAL) ในเปลือกผลระหว่างการเจริญของผลในสภาพ *in vivo*

เมื่อผลอายุได้ 98 วันหลังจากดอกบาน เลือกผลบนต้นที่ไม่มีสีแดงปรากฏหรือมีพื้นที่สีแดงปรากฏไม่เกิน 5 % จากพื้นที่เปลือกผลทั้งหมด รวมทั้งไม่มีโรคและแมลงรบกวน มาให้ได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตโดยการจุ่มผลดังกล่าวที่อยู่บนต้นด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (ภาพ 3.5) แตกต่างกัน 5 วิธีการดังนี้

วิธีการที่ 1	น้ำกลั่น (ชุดควบคุม)			
วิธีการที่ 2	สารละลาย ABA	ความเข้มข้น	200	ppm
วิธีการที่ 3	สารละลาย ABA	ความเข้มข้น	400	ppm
วิธีการที่ 4	สารละลายเอทีฟอน	ความเข้มข้น	200	ppm
วิธีการที่ 5	สารละลายเอทีฟอน	ความเข้มข้น	400	ppm

ในแต่ละวิธีการทำการจุ่มผลลงในสารละลายดังกล่าวซึ่งเติม detergent รวมด้วยเป็นเวลานาน 60 วินาที

จากนั้นปล่อยให้ผลบนต้นได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชดังกล่าวมีการเจริญเต็มที่ซึ่งมีอายุประมาณ 133 วันหลังจากดอกบาน โดยในระหว่างนี้ทุก 7 วัน ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างผลจากทั้ง 5 วิธีการ วิธีการละ 12 ผล (ซ้ำ) รวมผลทั้งหมดประมาณ 360 ผล มาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของเปลือกผลเช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 1 และ 2 ในเรื่องต่อไปนี [ทั้งนี้ ในระหว่างการทดลองนี้ทำการบันทึกการเปลี่ยนแปลงระดับอุณหภูมิอากาศ (°C) ความชื้นสัมพัทธ์ (%) และระยะเวลาที่มีแสงอาทิตย์ (hr) ในสวนมะม่วงที่ทำการทดลอง (ภาคผนวกภาพ 6)]

1. การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ

1.1 น้ำหนักผล

1.2 พื้นที่สีแดงของเปลือกผล

1.3 พื้นที่สีเหลืองของเปลือกผล

2. การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด

3. การเปลี่ยนแปลงแอกทิวิตีของเอนไซม์ PAL



ภาพ 3.5 วิธีการให้ผลมะม่วงพันธุ์มหาชนกได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชโดยการจุ่มผล

การทดลองที่ 3.2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชบางชนิดต่อแอกทิวิตีของฟีนอลอะลานีน แอมโมเนีย-ไลเอส (PAL) ในสภาพ *in vitro*

ในการทดลองนี้ใช้ตัวอย่างผลจากต้นที่ปราศจากการให้สารควบคุมการเจริญเติบโต โดยผลไม่มีพื้นที่สีแดงปรากฏบนเปลือกผล รวมทั้งไม่มีโรคและแมลงรบกวน เมื่อผลอายุได้ 100, 110 และ 120 วันหลังจากดอกบาน ทำการเก็บเกี่ยวผลจากต้นดังกล่าวจำนวน 12 ผล (ซ้ำ) ในแต่ละอายุ รวมผลทั้งหมดประมาณ 36 ผล มาทำการสกัด crude enzyme PAL จากเปลือกด้วยวิธีการดังกล่าวข้างต้นดังในการทดลองที่ 1 และ 2 จากนั้นนำ crude enzyme PAL ที่ได้

ไปวิเคราะห์เอกทิวติของเอนไซม์ PAL ในขั้นตอนที่ 2 และ 3 ตามลำดับ โดยในขั้นตอนที่ 2 นี้ได้มาสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่มีแตกต่างกันทั้งชนิดและระดับความเข้มข้นลงไปในการละลายที่จะวิเคราะห์หาเอกทิวติของเอนไซม์ PAL ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 วิธีการดังนี้

วิธีการที่ 1 สารละลาย ABA ความเข้มข้น 6 ระดับ คือ 0, 25, 50, 100, 200 และ 400 ppm

วิธีการที่ 2 สารละลายเอทิลอนความเข้มข้น 6 ระดับ คือ 0, 25, 50, 100, 200 และ 400 ppm

จากนั้นบันทึกและเปรียบเทียบผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชดังกล่าวต่อการเปลี่ยนแปลงเอกทิวติของเอนไซม์ PAL

3.6 การประเมินและวิเคราะห์ผล

โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Statistical Packages for the Social Science) วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance : ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย LSD (Least Significant Difference) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.7 สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. ไร่ประพัฒน์ และบุตร ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.8 ระยะเวลาดำเนินงานวิจัย

มีนาคม พ.ศ. 2546 ถึง มิถุนายน พ.ศ. 2548