บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การศึกษาอิทธิพลของการพรางแสงที่มีต่อการเจริญเติบโต ผลผลิต และสารทุติยภูมิบางชนิดในพญายอ มีวัสดุอุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีในการทดลองดังนี้

1. วัสดุอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี

1.1 วัสดุอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในแปลงทดลอง

1) พืชทดลอง ได้แก่ กิ่งชำพญายอ อายุ 2 เดือน จากแหล่งปลูก อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา โดยกิ่งชำมีความยาว 10 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ชำในกระบะชำด้วยแกลบดำ เป็นเวลา 1 เดือน แล้วย้ายลงปลูกในถุงดำ เป็นเวลา 1 เดือน จึงพร้อมที่จะย้ายลงปลูกในแปลงปลูก

2) วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการปลูกและดูแลพญายอ ได้แก่ ปุ๋ยคอก, ปุ๋ยเคมี สูตร 15-15-15 และปูนขาว

3) วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการปลูก บันทึกผลการเจริญเติบโตและการพรางแสง ได้แก่ จอบ เสียม มีด สมุด ดินสอ ไม้บรรทัด เสาไม้กระถินที่มีความสูงประมาณ 2.5 เมตร ลวด ตาข่ายพลาสติกสีดำ ให้แสงผ่านได้ในระดับ 30, 50 และ 70%

4) วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือที่ใช้ในการเก็บข้อมูล ได้แก่ เครื่องชั่งน้ำหนัก เครื่องวัดพื้นที่ใบ (Leaf area meter) เครื่องวัดขนาด (Verneer caliper) กระดาษเทียบสี (Color Chart) เครื่องวัดสี (Color meter) กล้องถ่ายรูป เครื่องมือวัดความเข้มแสง (Lux meter) เทอร์โมมิเตอร์ กระเป๋าแห้ง กระเป๋าเปียก

1.2 วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์สารทุติยภูมิและคลอโรฟิลล์

1) เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์สารทุติยภูมิและคลอโรฟิลล์ ได้แก่ เครื่องมือวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

2) วัสดุเครื่องแก้วที่ใช้ในการวิเคราะห์สารทุติยภูมิ และคลอโรฟิลล์ ได้แก่ กระดาษกรอง (filter paper), volumetric flask, beaker, cylinder, pipette

3) สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์สารทุติยภูมิ ได้แก่ ethanol 95%, methanol, β-sitosterol, acetonenitrile (CH_3CN), di-sodium hydrogen phosphate dodeca hydrate ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) Potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4)

4) สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์คลอโรฟิลล์ ได้แก่ acetone, ethanol 95%

1.3 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำสไลด์เนื้อเยื่อถาวร

1) เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์เนื้อเยื่อถาวร ได้แก่ เครื่องดูดอากาศ (suction pump) ตู้อบลมร้อน (hot air oven) slide warmer, และ rotary microtome

2) วัสดุเคมีที่ใช้ในการเตรียมสไลด์ถาวรได้แก่ slide, cover slip, beaker, staining jar และ vial

3) สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสไลด์ถาวรดังนี้คือ

- สารเคมีสำหรับฆ่าเนื้อเยื่อ และรักษาสภาพเซลล์ เพื่อศึกษาลักษณะทางกายวิภาค (killing and fixing solution)
- สารเคมีสำหรับดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution) (Chinachit, 1991)
- สารเคมีตัวกลางที่ใช้สำหรับฝังเนื้อเยื่อเพื่อตัด (embedding media) ได้แก่ Paraplast
- น้ำยายึดเนื้อเยื่อให้แน่นกับสไลด์ (adhesive)
- น้ำยาสำหรับทำให้เนื้อเยื่อสะอาด (clearing reagent) ได้แก่ xylene
- สีสำหรับย้อมเนื้อเยื่อคือ toluidine blue 0.5%
- สารตัวกลางสำหรับปิดสไลด์ คือ Canada balsam

2. ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมแปลงและการพรางแสง

ทำการเตรียมดิน โดยไถ 2 ครั้ง ตากดินประมาณ 15 วัน ใส่ปุ๋ยคอก อัตรา 3,000 กิโลกรัมต่อ/ไร่ ขนาดแปลง กว้าง 1.5 เมตร ยาว 3 เมตร โดยให้แต่ละ ทรีตเม็นต์ได้รับแสงต่างกัน โดยใช้ตาข่ายพรางแสงสีดำ (Saran fabic shade cloth) สูงจากพื้น 2 เมตร กว้าง 2.1 เมตร ยาว 3.6 เมตร เฉียงลงด้านทิศตะวันออกและตะวันตก 45 องศา

2.2 การปลูกและการดูแลรักษาพญายอ

2.2.1 ทำการปักชำกิ่งพญายอ โดยตัดกิ่งยาว 10 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรลงชำในตะกร้าพลาสติก โดยใช้แกลบดำเป็นวัสดุปักชำเมื่ออายุครบ 1 เดือน ย้ายลงถุงดำเพื่อให้รากเจริญเติบโตที่ดียิ่งขึ้น หลังจากนั้น 1 เดือน ย้ายลงปลูกในแปลงปลูก ระยะห่าง 30x30 เซนติเมตร

2.2.2 การดูแลรักษา การให้น้ำด้วย sprinker สัปดาห์ละ 2 ครั้ง วันละ 2 ชั่วโมง ให้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ทุก 1 เดือน ใช้อัตราส่วน 50 กิโลกรัมต่อไร่ หลังจากปลูกพญายอได้ 4 เดือน ทำการตัดต้นพญายอให้เหลือตอยาว 5 เซนติเมตร แล้วให้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 อัตรา 50 กิโลกรัมต่อไร่ และพรวนดิน จากนั้นวัดการเจริญเติบโตกิ่งที่งอกขึ้นมาใหม่ทุกเดือน เมื่ออายุครบ 4 เดือน ในเดือนมกราคม 2547 จึงทำการตัดต้นพญายอให้เหลือ 5 เซนติเมตร เพื่อเก็บผลผลิตครั้งที่ 1 และปฏิบัติครั้งที่ 2 และ 3 เช่นเดียวกันกับปฏิบัติในครั้งแรกโดยทำการเก็บผลผลิตครั้งที่ 2 ในเดือน พฤษภาคม และในครั้งที่ 3 ในเดือนกันยายน 2547 จนอายุของพญายอครบ 1 ปี ซึ่งจะได้ผลผลิตทั้งหมด 3 ครั้ง

2.3 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Completely Block Design (RCBD) โดยใช้ต้นพันธุ์พญายอจากแหล่งปลูกอำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา สิ่งทดลองคือการปลูกภายใต้การพรางแสงที่ต่างกัน 4 ระดับ โดยมี 4 ซ้ำ

1) ไม่พรางแสง

2) พรางแสง 30%

3) พรางแสง 50%

4) พรางแสง 70%

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของการเจริญเติบโตในด้านต่างๆ ผลผลิตของพญายอ และสารทุติยภูมิด้วยวิธี RCBD และวิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างฤดูใช้วิธี combine analysis แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรม SAS 8.01 (8e)

2.4 การบันทึกผลการทดลอง

2.4.1 การบันทึกผลการเจริญเติบโต

- ความสูงต้น (เซนติเมตร) ทำการวัดทุกเดือน ในแต่ละทุกฤดูกาล โดยวัดจากโคนของกิ่งที่งอกออกมาจากตาข้าง ไปถึงปลายยอด

- จำนวนกิ่งแขนงต่อต้น โดยนับทุกเดือน

- จำนวนข้อต่อต้น ทำการนับจำนวนจำนวนข้อแต่ละต้น ทุก 1 เดือน ทุกฤดูกาล

- ความยาวปล้อง วัดความยาวปล้อง จากกิ่งที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้วคิดเฉลี่ยเป็นความยาวปล้อง

- ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น ทำการวัดทุกเดือน โดยใช้เวอร์เนียร์วัดบริเวณข้อที่เจริญเติบโตเต็มที่ ทุกเดือน

- ความกว้างใบและความยาวใบ (เซนติเมตร) โดยวัดทุก 1 เดือน สุ่มใบที่เจริญเติบโตเต็มที่จำนวน 5 ใบต่อต้นแล้วจึงคิดเป็นค่าเฉลี่ย

- จำนวนใบต่อต้น ทำการนับทุกเดือน

- พื้นที่ใบ (ตารางเซนติเมตร) โดยใช้เครื่องวัดพื้นที่ใบ โดยใช้ใบที่เจริญเติบโตเต็มที่ประมาณใบคู่ที่ 3-4 จากยอด เป็นจำนวน 5 ใบต่อต้น ทุกเดือน

2.5 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโต

หลังจากปลูกพญายอในวันที่ 1 มิถุนายน 2546 จนถึงวันที่ 30 กันยายน 2546 เป็นเวลา 4 เดือนจึงเริ่มทำการตัดต้นพญายอเพื่อเริ่มบันทึกการทดลองตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2546 จนถึง วันที่ 30 กันยายน 2547 โดยการวัดการเจริญเติบโตในแต่ละฤดูดังนี้

วัดการเจริญเติบโตในฤดูหนาว

-วัดการเจริญเติบโตครั้งที่ 1 วันที่ 30 ตุลาคม 2546

-วัดการเจริญเติบโตครั้งที่ 2 วันที่ 30 พฤศจิกายน 2546

-วัดการเจริญเติบโตครั้งที่ 3 วันที่ 30 ธันวาคม 2546

-วัดการเจริญเติบโตครั้งที่ 4 วันที่ 30 มกราคม 2547

วัดการเจริญเติบโตในฤดูร้อน

-วัดการเจริญเติบโตครั้งที่ 1 วันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2547

-วัดการเจริญเติบโตครั้งที่ 2 วันที่ 30 มีนาคม 2547

-วัดการเจริญเติบโตครั้งที่ 3 วันที่ 30 เมษายน 2547

-วัดการเจริญเติบโตครั้งที่ 4 วันที่ 30 พฤษภาคม 2547

วัดการเจริญเติบโตในฤดูฝน

-วัดการเจริญเติบโตครั้งที่ 1 วันที่ 28 มิถุนายน 2547

-วัดการเจริญเติบโตครั้งที่ 2 วันที่ 30 กรกฎาคม 2547

-วัดการเจริญเติบโตครั้งที่ 3 วันที่ 30 สิงหาคม 2547

-วัดการเจริญเติบโตครั้งที่ 4 วันที่ 30 กันยายน 2547

2.6 การศึกษาเปรียบเทียบผลผลิต

หลังจากปลูกพญายอเป็นเวลาเป็นเวลา 4 เดือนจึงทำการตัดต้นพญายอเพื่อบันทึกผลผลิตใน 3 ครั้งคือ

- ช่วงฤดูหนาวเก็บผลผลิตและบันทึกข้อมูลวันที่ 30 มกราคม 2547

- ช่วงฤดูร้อนเก็บผลผลิตและบันทึกข้อมูลวันที่ 30 พฤษภาคม 2547

- ช่วงฤดูฝนเก็บผลผลิตและบันทึกข้อมูลวันที่ 30 กันยายน 2547

นำพญายอที่ตัดได้แยกใบและกิ่งออกจากกัน ชั่งน้ำหนักใบสดด้วยเครื่องชั่งด้วยทศนิยม 2 ตำแหน่ง หลังจากนั้นนำใบไปตากในที่ร่มอากาศถ่ายเทได้สะดวกเป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำใบแห้งที่ได้นำมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง แล้วจึงนำไปแห้งที่ได้เก็บในถุงพลาสติกสีดำ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20 °C บันทึกผลผลิตที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ

การบันทึกผลผลิตใบของพญายอ

- น้ำหนักใบสด (กรัมต่อต้นและกิโลกรัมต่อไร่) นำผลผลิตใบสดที่ได้มาชั่งน้ำหนักบันทึกน้ำหนักในแต่ละทรีตเม็นต์ ทุกฤดูกาล

- น้ำหนักใบแห้ง (กรัมต่อต้นและกิโลกรัมต่อไร่) หลังจากใบสดที่ได้ผ่านการอบจนใบแห้งแล้วบันทึกน้ำหนักที่ได้ในทุกทรีตเม้นต์และทุกฤดูกาล

- ค่าดัชนีการเก็บเกี่ยวใบแห้งของพญายอ ได้จากการนำเอาพญายอทั้งต้นอบให้แห้งที่ 40 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาคำนวณค่าดัชนีการเก็บเกี่ยวได้จากสูตร (Nichiporovich, 1960 อ้างโดย เฉลิมพล, 2535)

$$\text{ดัชนีเก็บเกี่ยวผลผลิตใบแห้ง} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งของใบ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักแห้งรวม (กรัม)}}$$

2.7 การหาปริมาณสารทุติยภูมิ

1) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ชั่งสาร β-sitosterol 0.05 กรัม ปรับปริมาตรด้วย 95% ethyl alcohol ให้ครบ 50 มิลลิลิตร นำสารมาตรฐานของ β-sitosterol เจือจางให้มีความเข้มข้น 0.9, 0.7, 0.5, 0.3 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2) การเตรียมตัวอย่างพืช

ชั่งตัวอย่างใบพญายอที่บดด้วยเครื่องบดสมุนไพรในแต่ละทรีตเม็นต์อย่างละ 1 กรัม ใส่ใน volume metric flask ขนาด 100 มิลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 95% ethyl alcohol จนครบ 100 มิลิลิตร หมักไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3) ระบบที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

การหาปริมาณสารทุติยภูมิด้วยเทคนิค HPLC โดยนำใบของพญายอในแต่ละทรีตเม็นต์และในแต่ละช่วงฤดู ที่ตากแห้งแล้ว มาทำการศึกษาสารสกัดโดยใช้เทคนิค HPLC โดยใช้

- เครื่อง HPLC Perkin Elmer รุ่น LC200
- stationary phase เป็น ชนิด C-18 Nova-Pak® ขนาด 3.9x150 มิลลิเมตร
- HPLC injector แบบ Fixed loop ขนาด 20 µl

- Mobil phase โดย เตรียม $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$ ปริมาณ 2.52 กรัม และ KH_2PO_4 1.505 กรัม ด้วยน้ำกลั่น HPLC 40 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย phosphoric acid จนได้ pH4 แล้วเติมน้ำให้ครบ 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติม acetonitrile 215 มิลลิลิตร กรองด้วยเครื่องกรอง membrane จากนั้นนำไปไล่อากาศ (de-gas) ด้วยเครื่อง sonicalor 30 นาที

4) การบันทึกผล

- บันทึกตำแหน่งเวลาที่เกิดกราฟของสาร (retention time)
- บันทึกค่าพื้นที่ใต้กราฟ และลักษณะกราฟ

5) การประเมินผล

- คำนวณหาปริมาณ β-sitosterol โดยใช้ค่าพื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่างใบพญายอเปรียบเทียบกับ calibration ของสาร β-sitosterol

2.8 การหาปริมาณคลอโรฟิลล์

การหาปริมาณคลอโรฟิลล์ a b และรวม โดยใช้ใบที่มีการเจริญเติบโตสูงสุด โดยวิธีของ Armon, 1914 โดยใช้เครื่องมือวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (ภาคผนวกที่ 1)

2.9 การศึกษาทางกายวิภาพ

การศึกษาทางกายวิภาคโดยเทคนิคไสด์ถาวรเนื้อเยื่อพืช โดยวิธีการ paraffin embedding ตามวิธีของ Gerlach (1977, sited after Chinachit, 1991 (ภาคผนวกที่ 2)

2.10 การศึกษาสภาพแวดล้อมบริเวณแปลงปลูกพญายอ

การศึกษาทางด้านอุตุนิยมวิทยาบริเวณแปลงปลูกพญายอ

1) อุณหภูมิของอากาศ

ทำการวัดอุณหภูมิของอากาศบริเวณเหนือทรงพุ่ม บันทึกอุณหภูมิจากเทอร์โมมิเตอร์ชนิดสูงสุดและต่ำสุด ของทุกวันจันทร์ ตลอดช่วงการทดลอง คำนวณหาอุณหภูมิเฉลี่ยในแต่ละฤดูโดย

$$\text{อุณหภูมิอากาศเฉลี่ย} = \frac{\text{อุณหภูมิต่ำสุดเฉลี่ย} + \text{อุณหภูมิสูงสุดเฉลี่ย}}{2}$$

2) ความชื้นสัมพัทธ์

การวัดความชื้นสัมพัทธ์ได้จากเทอร์โมมิเตอร์กระเปาะเปียกและกระเปาะแห้ง เวลา 12.00 น. ของทุกวันจันทร์ แล้วนำค่าที่ได้มาเทียบในตารางเทียบค่าในตารางความชื้นสัมพัทธ์

3) ปริมาณน้ำฝน

ใช้ข้อมูลจากสถานีตรวจอากาศ หมวดพืชไร่ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

4) วัดความเข้มแสง

ทำการวัดความเข้มแสงบริเวณเหนือทรงพุ่ม กึ่งกลางแปลง โดยใช้เครื่องมือ Lux meter ของบริษัท Minola รุ่น Illuminance T-10 ในทุกวันจันทร์ 12.00 น. ตลอดช่วงเวลาที่ทำการทดลอง

5) ความยาวช่วงวัน

ใช้ข้อมูลจากสถานีตรวจอากาศ หมวดพืชไร่ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3. สถานที่ทำการทดลอง

1. หมวดไม้ผล ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
2. ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
3. ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

4. ระยะเวลาทำการทดลอง

เริ่ม 1 มิถุนายน 2546 สิ้นสุด 30 ก.ย. 2547