บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

พืชทดลอง

มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทอง (*Mangifera indica* Linn. cv Nam Dok Mai Si Tong)

สารเคมี

1. Acetonitri HPLC grade (LAB-SCAN®, Thailand)
2. Acetic acid (Labscan®,A8401)
3. Ammonium acetate (CH_3COONH_4)(Merck®, 1.01116.1000)
4. Ammonium molybdate ($[(NH_4)]_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) (Ajax Finechem®, A46)
5. Ammonium solution 32% (Merck®, 1.05426.1000)
6. Copper (II) sulfate-pentahydrate ($CuSO_4.5H_2O$) (Merck®, A501690)
7. DEAE-sephadex (Sigma®, A25120)
8. Deionized distill water 1 MΩ
9. Deionized distill water 18 MΩ
10. D-Glucose anhydrous ($C_6H_{12}O_6$) (Ajax Finechem®, A783)
11. Diethyl ether (Labscan®, A3509)
12. Disodium hydrogen arsenate ($Na_2HAsO_2.7H_2O$) (Sigma®, S9663)
13. Hydrochloric acid 37% (HCl) (Labscan®, A8601)
14. Hydrogen peroxide 30% (H_2O_2) (Merck®, 8.22287.1000)
15. Methanol (CH_3OH) (Labscan®, A3513)
16. Poly(vinylpolypyrrolidone) – PVP (Sigma®, P6755)
17. Sep-Pak-C_{18} (Sep-Pak Classic, Ireland)
18. Sodium potassium tartrate ($KNaC_4H_4O_6.4H_2O$) (Ajax Finechem®, A416)
19. Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) (Ajax Finechem®, 476)
20. Sodium carbonate anhydrous (Na_2CO_3) (Merck®, A836892)
21. Sodium hydroxide 97% (NaOH) (Labscan®, K2004)

22. Sodium sulfate anhydrous (Na_2SO_4) (Ajax Finechem®, A503)
23. Sulfuric acid 98% (H_2SO_4) (Labscan®, A8301)
24. Triethanolamine (Ajax Finechem®, Australia)

อุปกรณ์

1. Beaker ขนาด 50, 100, 250, 600, 1,000 และ 2,000 มิลลิลิตร
2. Cuvette แก้ว (Starna®, England)
3. Glassfilter inner เบอร์4
4. Handy step (Brand®, Germany)
5. Magnetic bar
6. Magnetic stirrer
7. Micropipette ขนาด 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (Pipettman Gilson®, Germany)
8. Pasture pipette
9. Pipette tip ขนาด 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
10. Speed vacuum concentrator
11. กรวยกรอง
12. กรองแก้ว filter crucible 50 ml (DURAN®, 258513406, Germnay)
13. กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman®, England)
14. กระดาษทิชชู
15. โกร่งบดตัวอย่าง
16. ขวดก้นกลม (Rotary flask)
17. ขวดปรับปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร (ISO LAB®, Germany)
18. ขวดพลาสติกขนาด 60 มิลลิลิตร
19. ขวดสีชาสำหรับเก็บสารเคมี (Duran®, Germany)
20. เครื่อง Ultrasonic bath (D.S.C. Group®, Thailand)
21. เครื่อง Vortex mixer (Scientific Industries®, USA)
22. เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนสูง (High Performance Liquid Chromatography : HPLC, SHIMADZU®, SCL-10A VP, Fluorimeter detector, SHIMADZU®, RF-10A XL, Japan)
23. เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo®, Switzerland)

24. เครื่องทำตัวอย่างให้แห้งโดยความเย็น (Freeze drier, FTS®)
25. เครื่องบดตัวอย่าง (Phillips® HR 2021, China)
26. เครื่องพ่นยา
27. เครื่องระเหยสารภายใต้สภาพแรงดันต่ำ (Rotary evaporator, BUCHI® Rotavapor R-114, Switzerland)
28. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Shimadzu ® UV-1601, Japan)
29. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Sartorius Professional Meter ® PP-50, Taiwan)
30. เครื่องหมุนเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ (KUBOTA ®, Japan)
31. ช้อนตักสาร
32. ตะแกรงวางหลอดทดลอง
33. ตู้เย็น
34. ตู้อบ (Hot air oven, Memmert ®, Germany)
35. ถุงกระดาษ
36. ถุงพลาสติก
37. ถุงมือยาง (Sempermed ®, Thailand)
38. โถดูดความชื้น
39. ไนโตรเจนเหลว (Liquid Nitrogen)
40. ลูกยางดูดสาร
41. หน้ากากปิดจมูก (Star ®, Thailand)
42. หลอดแก้วทดลอง (Test tube) ขนาด 10 และ 50 มิลลิลิตร
43. หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง (Centifuge tube) ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร
44. อลูมิเนียมฟอยด์
45. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert ®, Germany)

วิธีการทดลอง

1. แผนการดำเนินงาน

วางแผนการทดลองแบบ Factorial (3x3)+1 in Randomized Complete Block Design มี 3 บล็อก บล็อกละ 10 ต้น ประกอบด้วยปัจจัยที่ศึกษา คือ

ปัจจัยที่1 คือ ชนิดของสารชะลอการเจริญเติบโต 3 ชนิด คือ พาโคลบิวทราโซล ยูนิโคนาโซล และคลอมีควอทคลอไรด์ แต่ละชนิดใช้ความเข้มข้น 2000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปัจจัยที่ 2 คือ จำนวนครั้งในการพ่นสาร 3 ระดับ คือ พ่น 1, 2 และ 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งพ่นห่างกัน 1 สัปดาห์

โดยทำการพ่นครั้งแรกในระยะใบเพสลาดของการแตกใบอ่อนครั้งที่สองวันที่ 13 ตุลาคม 2551

2. การเตรียมต้นมะม่วง

2.1 การเลือกต้น

ทำการทดลองที่สวนมะม่วงสันทราย อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ โดยใช้ต้นมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทองอายุ 7-8 ปี ที่มีความสมบูรณ์ จำนวน 30 ต้น

2.2 การบำรุงต้น

หลังการแตกใบอ่อนครั้งที่ 1 ในวันที่ 8 กรกฎาคม 2551 ทำการกำจัดวัชพืชบริเวณโคนต้นและใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ต้นละ 1 กิโลกรัม

หลังการแตกใบอ่อนครั้งที่ 2 ในวันที่ 19 กันยายน 2551 ทำการใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ต้นละ 1 กิโลกรัมและทำการพ่นสารโพแทสเซียมไนเตรท (13-0-46)

ภาพที่ 8 ต้นมะม่วงที่ทำการทดลอง

3. การให้สารชะลอการเจริญเติบโต

พ่นสารพาโคลบิวทราโซล โดยละลายพาโคลบิวทราโซล 400 กรัมในน้ำ 20 ลิตร จากนั้นเติมสารจับใบ (Tween-20) จำนวน 5 หยด ผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึงทำการพ่นให้ทั่วทรงพุ่ม

พ่นสารยูนิโคนาโซล โดยละลายยูนิโคนาโซล 800 กรัมในน้ำ 20 ลิตร จากนั้นเติมสารจับใบ (Tween-20) จำนวน 5 หยด ผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึงทำการพ่นให้ทั่วทรงพุ่ม

พ่นสารคลอมีควอทคลอไรด์ โดยละลายคลอมีควอทคลอไรด์ 40 มิลลิลิตร ในน้ำ 20 ลิตร จากนั้นเติมสารจับใบ (Tween-20) จำนวน 5 หยด ผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึงทำการพ่นให้ทั่วทรงพุ่ม

4. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างใบและยอด ในวันที่ 0, 13, 28, 42, 49, 55, 63 และ 70 หลังกรรมวิธี

5. การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้างในใบ (Total Non-structural Carbohydrate; TNC)

ทำการเก็บตัวอย่างใบ โดยเลือกเอาใบที่ 3-5 เมื่อนับจากยอดลงมา จำนวน 3 ใบใส่ลงในไนโตรเจนเหลวทันที จากนั้นนำตัวอย่างมาบดและทำให้แห้งด้วยความเย็น โดยใช้เครื่อง freeze drier เป็นเวลาประมาณ 4 วัน หลังจากที่ใบมะม่วงแห้งดีแล้วนำมาบดอีกครั้งด้วยเครื่องบดไฟฟ้า และเก็บไว้ในถุงกระดาษ เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไปตามวิธีของ Hodge and Hofreiter (1962) ที่ดัดแปลงโดย สุจริต (2531)

การสกัด TNC จากใบมะม่วงจะใช้สารละลายกรดเจือจาง (0.2 N H_2SO_4) โดยนำใบมะม่วงที่บดละเอียดและปราศจากความชื้นไปชั่งน้ำหนัก 0.05 กรัม แล้วใส่ลงในหลอดทดลองแก้วขนาด 60 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริค 0.2 N ลงไป 40 มิลลิลิตร แล้วนำกระดาษอลูมิเนียมมาปิดปากหลอดทดลอง ก่อนนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างมาลดอุณหภูมิโดยนำไปแช่ในน้ำเย็นหรือน้ำแข็ง แล้วปรับ pH ให้มีค่าเป็น 7 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 M และ 0.1 M หรือ H_2SO_4 ความเข้มข้น 0.2 N จากนั้นนำมาปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วนำมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 โดยเก็บสารละลายที่ได้ไว้ในขวดพลาสติกขนาด 60 มิลลิลิตร และนำไปแช่ในตู้เย็นเพื่อรอทำการวิเคราะห์ต่อไป

การเตรียมสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน

สารละลายน้ำตาลมาตรฐานเตรียมโดยดูดสารละลาย D-Glucose ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มา 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นในแต่ละหลอดจนมีปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้สารละลายน้ำตาลมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.025, 0.050, 0.075, 0.100, 0.125, 0.150, 0.175, 0.200, 0.225 และ 0.250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1. การเตรียมกราฟมาตรฐาน (Standard curve)

นำสารละลายน้ำตาลมาตรฐานที่เตรียมไว้ใส่หลอดทดลองปริมาณ 1 มิลลิลิตร เติมสาร Nelson's alkaline copper reagent ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วปิดด้วยกระดาษอลูมิเนียม จากนั้นนำไปแช่ใน water bath อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีโดยนำมาแช่ในน้ำเย็น เมื่อหลอดเย็นแล้วเติมสารละลาย arsenomolybdic acid ลงหลอดละ 1 มิลลิลิตร

เขย่าเพื่อให้ตกตะกอนของ copper sulfate ($CuSO_4$) ละลายจนหมด แล้วเติมน้ำกลั่นลงไป 7 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันอีกครั้ง ตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเขียนเป็นกราฟมาตรฐาน โดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ glucose (แกน X) กับค่าการดูดกลืนแสง (แกนY)

2. การวิเคราะห์ปริมาณ TNC ในใบมะม่วง

นำสารละลายที่สกัดได้จากตัวอย่างใส่ในหลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร จากนั้นทำเช่นเดียวกับการเตรียมกราฟมาตรฐาน นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ทำไว้แล้ว คำนวณปริมาตรเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ D-Glucose ต่อน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง

3. วิธีการคำนวณ

$$TNC = \frac{\text{mg glucose equivalent x vol make}}{\text{Wt. of sample x vol take}}$$

vol make = ปริมาตรสุดท้ายหลังจากปรับ pH ให้เป็น 7 (50 มิลลิลิตร)

vol take = ปริมาตรของสารละลายที่ใช้ทดสอบค่าการดูดกลืนแสง (1 มิลลิลิตร)

6. การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน

6.1 การสกัดตัวอย่างพืช (plant sample extraction)

1) นำตัวอย่างพืชที่เก็บไว้ไปทำให้แห้งด้วยความเย็นภายใต้สุญญากาศ ด้วยเครื่อง freeze drier ชั่งน้ำหนักตัวอย่างพืช โดยตัวอย่างใบ ใช้ 0.5 กรัม ส่วนตัวอย่างยอดใช้ 0.03 – 0.06 กรัม จากนั้นบดตัวอย่างให้ละเอียดด้วยโกร่ง โดยเติมไนโตรเจนเหลวขณะทำการบด เพื่อรักษาสภาพความเย็น

2) เติมเมทานอลเย็น (เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส) ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 50 มิลลิลิตร

3) เก็บสารสกัดใส่ขวด ปิดฝาเก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำสารสกัดมากรองด้วย glassfliter inner เบอร์ 4 ใส่ลงในขวดก้นกลม (rotary flask) แล้วนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator (<40°C) จนสารละลายเหลือประมาณ 2-3 มิลลิลิตร

4) นำสารละลายที่เหลือมาล้างด้วย 0.01 M ammonium acetate 4 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง โดยใช้ ultrasonic bath

5) เก็บสารละลาย ammonium acetate ที่ได้มารวมกันในหลอดปั่นเหวี่ยง แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

6) นำสารสกัดตัวอย่างที่ -20 องศาเซลเซียส มาละลายให้เป็นของเหลว แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,500 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเทส่วนใส (supernatant) ลงในขวดแก้วขนาด 30 มิลลิลิตร

7) นำสารสกัดเทผ่านคอลัมน์และ Sep-Pak-C_{18} ซึ่งเป็นการทำสารสกัดพืชให้บริสุทธิ์ โดยวิธีการเตรียมดังต่อไปนี้

6.2 การเตรียมคอลัมน์

คอลัมน์ประกอบด้วย 4 ส่วน คือ

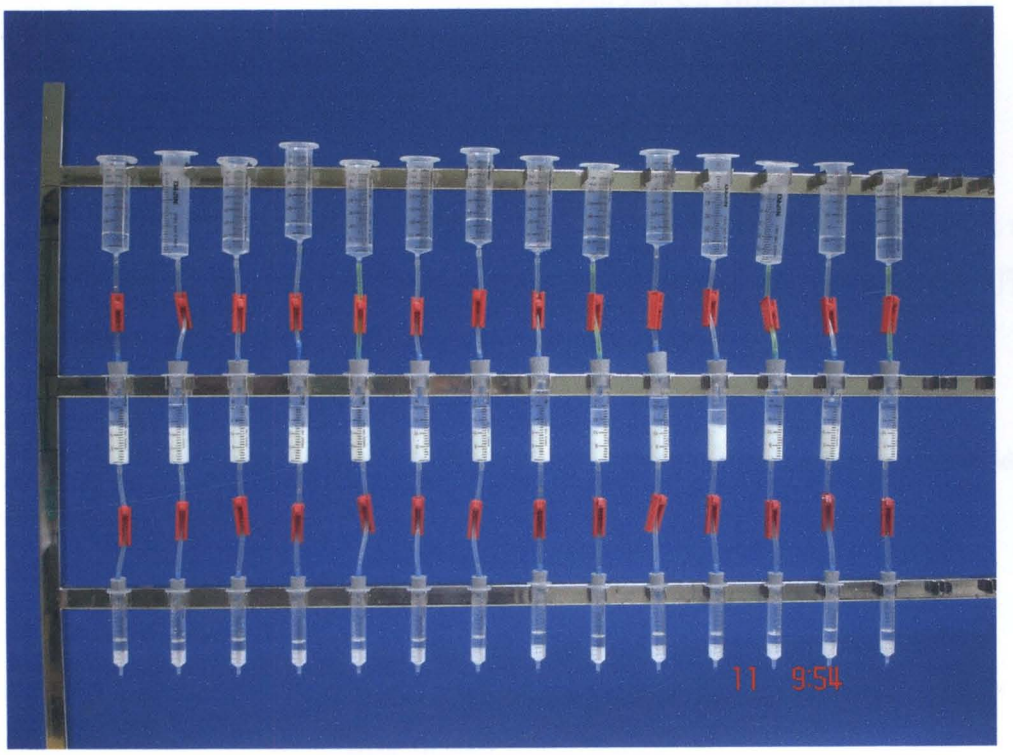
1) หลอดบรรจุสารละลาย (reservoir)
2) หลอดบรรจุ PVP (Polyvinylpyrrolidone)
3) หลอดบรรจุ DEAE-sephadex (anion exchange)
4) Sep-Pak-C_{18} cartridge

โดยระหว่างหลอดจะมีวาล์วบังคับการไหลของสารละลาย เริ่มต้นโดยเติม PVP 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดส่วนที่ 2 และเติม DEAE-sephadex 4 มิลลิลิตร ลงในหลอดส่วนที่ 3 ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง โดยนำหลอดส่วนที่ 1, 2 และ 3 มาต่อกัน (ยังไม่ใช้ Sep-Pak-C_{18} cartridge) จากนั้นเติม 0.1 M ammonium acetate pH 8.5 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 1 แล้วเปิดวาล์วให้สารละลายไหลผ่าน PVP ในหลอดที่ 2 และ DEAE-sephadex ในหลอดที่ 3 และปล่อยสารละลาย ammonium acetate ให้ไหลจนหมด (ระวังอย่าให้ส่วนของ PVP และ DEAE-sephadex แห้ง) จากนั้นเติม 0.01 M ammonium acetate pH 7.5 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 1 ให้สารละลายไหลผ่าน PVP ในหลอดที่ 2 และ DEAE-sephadex ในหลอดที่ 3 และปล่อยสารละลาย ammonium acetate ให้ไหลจนหมด (ระวังอย่าให้ส่วนของ PVP และ DEAE-sephadex แห้ง) จากนั้นปิดวาล์ว

6.3 การปรับสภาพของ Sep-Pak-C_{18} cartridge ก่อนการใช้งาน

Cytokinins

- ผ่านเมทานอล (100%) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร 2 ครั้ง
- ผ่าน 0.01 M ammonium acetate pH 7.5 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร 2 ครั้ง



ภาพที่ 9 ส่วนประกอบของคอลัมน์

6.4 การทำให้บริสุทธิ์ของสารละลายตัวอย่าง

1) นำ cytokinins Sep-Pak-C_{18} ที่เตรียมไว้มาต่อเข้าที่ปลายคอลัมน์ นำสารสกัดที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาเติมลงในหลอดที่ 1 (reservoir) เปิดวาล์วให้สารละลายไหลผ่านคอมลัมน์จนหมดแล้วล้างขวดสารสกัดซ้ำอีกครั้งด้วย 0.01 M ammonium acetate pH 7.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง ผ่านลงในคอลัมน์ ปล่อยให้สารละลายไหลผ่านจนหมด (ระวังไม่ให้สารละลายในระบบแห้ง) เมื่อถึงขั้นตอนนี้ ฮอร์โมน cytokinins จะถูกจับอยู่ใน Sep-Pak-C_{18}

2) ถอด cytokinins Sep-Pak-C_{18} ออกจากคอลัมน์

3) การชะฮอร์โมนออกจาก Sep-Pak-C_{18} ทำได้โดย

- ล้าง Sep-Pak-C_{18} ด้วยสารละลาย 0.1 M acetic acid ปริมาตร 4 มิลลิลิตร
- ล้างด้วย 15% methanol in 0.1 M acetic acid ปริมาตร 4 มิลลิลิตร
- ชะเอาฮอร์โมนออกจาก Sep-Pak-C_{18} ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ดังนี้

Z/ZR	30% methanol in 0.1 M acetic acid ปริมาตร 4 มิลลิลิตร
i-Ado/i-Ade	80% methanol in 0.1 M acetic acid ปริมาตร 4 มิลลิลิตร

เมื่อชะเอาฮอร์โมนออกเรียบร้อยแล้วจึงล้าง Sep-Pak-C_{18} ให้สะอาดเพื่อนำมาใช้งานครั้งต่อไป ดังนี้

- ล้างด้วย 100% methanol ปริมาตร 4 มิลลิลิตร 2 ครั้ง
- ล้างด้วย diethyl ether ปริมาตร 4 มิลลิลิตร 1 ครั้ง

เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการจะได้สารละลายฮอร์โมนชนิดต่างๆ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอดตัวอย่างไประเหยแห้งในเครื่อง speed vacuum concentrator เพื่อรอการวิเคราะห์ปริมาณโดยเครื่อง HPLC ต่อไป

การวิเคราะห์โดยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography : HPLC)

การวิเคราะห์ Cytokinins

Column	:	Prontosil Hyper sort-b ODS 0.5 µm		
		BISCHOFF Chromatography ®		
Mobile phase	:	A= 0.1 M acetic acid in water		
		(ปรับpH 3.4 ด้วย Triethanolamine) + 50 ml ACN		
		B = Acetonitrile		
Flow rate	:	1 ml/min		
Time Program	:	Time	Event	value
		00.01	B.conc	10.0
		20.00	B.conc	40.0
		25.00	B.conc	70.0
		27.00	B.conc	10.0
		30.00	B.conc	10.0
Flow rate	:	1 ml/min		
Detector	:	Diode Array = 265 nm.		

สถานที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. ห้องปฏิบัติการสาขาวิชาพืชสวน ภาควิชาพืชศาสตร์ และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2. ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

เดือนตุลาคม 2551 – เมษายน 2553