บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้วต่าง ๆ
2. มีดปอกผลไม้
3. กระบอกน้ำกลั่น
4. สำลี
5. อะลูมิเนียมฟลอยด์
6. หลอดหยด
7. micro pipette
8. กล้องถ่ายรูป และ ฟิล์ม
9. แผ่นป้ายพลาสติก
10. ถุงกระดาษสีน้ำตาลสำหรับห่อผลของบริษัท Kobayashi Seitai Sangyo Ltd., Japan
11. แผ่นสะท้อนแสง

เครื่องมือ

1. เครื่องวัดสี (chromameter) ยี่ห้อ Minolta model CR - 200
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง
3. spectrophotometer ยี่ห้อ Miton Roy Company model Spectronic 21
4. UV – visible recording spectrophotometer ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น UV - 2100
5. ตู้เย็น
6. ตู้อบไฟฟ้า
7. water bath
8. เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง
9. digital vernier ยี่ห้อ Mitutoyo รุ่น CD – 15

สารเคมี

1. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ใช้
   - NAA (β - Naphthalene acetic acid) ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA
   - BA (N^6-Benzyladenine) ของบริษัท Fluka BioChemica, Switzerland
   - GA_3 (Gibberllic acid (3)) ของบริษัท Fluka BioChemica, Switzerland
   - ABA (Abscisic acid) ของบริษัท Toray Industries, Inc., Japan
   - Ethephon (2 - Chloroethylphosphonic acid) ของบริษัทโรห์นปูแลงค์อะโกร (ประเทศไทย) จำกัด

2. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน
   - ethanolic HCl ซึ่งเตรียมได้จาก 95% ethyl alcohol (C_2H_5OH) 85 ml + 1.5 N hydrochloric acid (HCl) 15 ml

3. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ PAL
   - boric acid (H_3BO_3)
   - sodium borate ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$)
   - phenylalanine ($C_9H_{11}NO_2$)
   - cinnamic acid ($C_9H_8O_2$)
   - Bovine Serum Albumin (BSA)
   - Folin – Ciocalteu's phenol reagent
   - copper sulphate ($CuSO_4 \cdot 5 H_2O$)
   - potassium tartrate ($COOK(CHOH)_2 COOK \cdot 1/2 H_2O$)
   - sodium carbonate (Na_2CO_3)
   - perchloric acid ($HClO_4$)
   - mercaptoethanol
   - sodium hydroxide (NaOH)
   - polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)

4. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

- D – glucose ($C_6H_{12}O_6$)
- anhydrous sodium sulphate (Na_2SO_4)
- ethyl alcohol (C_2H_5OH)
- sodium carbonate (Na_2CO_3)
- sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)
- sodium potassium tartrate ($COOK.(CHOH)_2 COONa \cdot 4H_2O$)
- ammonium molybdate ($(NH_4)_6 MoO_{24} \cdot 4H_2O$)
- sodium arsenate ($Na_2HASO_4 \cdot 7H_2O$)
- sulphuric acid (H_2SO_4)

พืชทดลอง

มะม่วงพันธุ์เคนท์จากไร่ประพัฒน์และบุตร ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่

วิธีการดำเนินงานวิจัย

ทำการคัดเลือกต้นมะม่วงพันธุ์เคนท์อายุประมาณ 8 - 10 ปีจำนวน 45 ต้นที่มีทรงพุ่มใกล้เคียงกันแล้วทำการติดป้ายช่อดอกในระยะที่ดอกบานเต็มที่เพื่อให้ทราบอายุของผลที่จะเก็บเกี่ยวมาวิเคราะห์ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design : CRD) แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของแสงต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ PAL และปริมาณรงควัตถุแอนโทไซยานินในเปลือกผลมะม่วงพันธุ์เคนท์

คัดเลือกผลมะม่วงที่มีอายุ 60 วันหลังจากดอกบานบนต้นมะม่วงดังกล่าวข้างต้น เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาผลของแสงต่อการเปลี่ยนแปลงแอคติวิตีของเอนไซม์ PAL และปริมาณรงควัตถุแอนโทไซยานิน โดยเมื่อผลที่อยู่บนต้นมีอายุ 60 วันหลังจากดอกบานจะทำการจัดให้ผลดังกล่าวได้รับแสงแตกต่างกัน 3 กรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ผลได้รับแสงในสภาพปกติธรรมชาติจากดวงอาทิตย์ (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 ผลไม่ได้รับแสงโดยการห่อผลบนต้นด้วยถุงกระดาษสำหรับห่อผลของบริษัท Kobayashi Seitai Sangyo Ltd., Japan ซึ่งมีขนาด 20 x 30 เซนติเมตร (รูปที่ 15)

กรรมวิธีที่ 3 ผลได้รับแสงในสภาพธรรมชาติ และได้รับแสงเพิ่มจากการใช้แผ่นสะท้อนแสง (รูปที่ 16) ซึ่งทำด้วยแผ่นพลาสติกขนาด 35 x 30 เซนติเมตร ที่หุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟลอยด์เพื่อสะท้อนแสงให้กับผล โดยวางห่างจากผลประมาณ 30 เซนติเมตร

สุ่มเก็บตัวอย่างผลจากต้นทั้งสามกรรมวิธีมาวิเคราะห์ในระหว่างการพัฒนาของผลทุก ๆ 5 วัน ตั้งแต่วันที่เริ่มการทดลองคือ 60 วันหลังจากดอกบาน จนกระทั่งถึงวันที่ผลสุกแก่เต็มที่คือ 115 วันหลังจากดอกบาน รวมจำนวน 10 ครั้ง โดยในแต่ละกรรมวิธีและแต่ละระยะเวลาจะเก็บตัวอย่างเพื่อมาวิเคราะห์จำนวน 10 ซ้ำ (ผล) รวมผลมะม่วงที่ต้องวิเคราะห์ทั้งหมดประมาณ 300 ผล โดยนำตัวอย่างผลในระยะเวลาต่าง ๆ มาศึกษาและวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงในเรื่องต่อไปนี้

1. การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของผลโดยนำผลที่สุ่มเก็บมาศึกษาในเรื่องขนาด น้ำหนัก และสีเปลือกของผลในระหว่างการพัฒนาของผล โดยมีวิธีการดังต่อไปนี้

1.1 การเปลี่ยนแปลงขนาดผล

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงขนาดผลโดยใช้เวอร์เนียวัดขนาดของผล ทั้งความกว้าง ความยาว และความหนา (วัดจากบริเวณแก้มผล 2 ด้าน) โดยให้ส่วนที่วัดเป็นส่วนที่มีความกว้าง ความยาว และความหนา มากที่สุดของผล

1.2 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักผล

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักผลโดยการชั่งน้ำหนักผลด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า 2 ตำแหน่ง

1.3 การเปลี่ยนแปลงสีเปลือกผล

1.3.1 การวัดสีเปลือกผล

วัดการเปลี่ยนแปลงสีเปลือกผลโดยใช้ Hunter ' s colormeter model CR - 200 Minolta แต่ละผลทำการวัดสีในส่วนหัว ส่วนกลาง และส่วนท้ายของผล ส่วนละ 3 ตำแหน่ง รวมทำการวัดสี 9 ตำแหน่งต่อผล ค่าที่ได้จากการวัดแสดงผลเป็นค่า L a และ b โดย

ค่า L เป็นค่าที่แสดงความมืดและความสว่างของสี มีค่าตั้งแต่ 0 - 100 ค่าต่ำแสดงว่ามีความสว่างน้อย ค่าสูงแสดงว่ามีความสว่างของสีมาก

รูปที่ 15 ถุงกระดาษที่ใช้สำหรับห่อผลมะม่วงในกรรมวิธีที่ 2

รูปที่ 16 การให้ผลมะม่วงได้รับแสงเพิ่มจากธรรมชาติโดยการใช้แผ่นสะท้อนแสงในกรรมวิธีที่ 3

ค่า a เป็นค่าที่แสดงสีเขียวและสีแดง ถ้ามีค่าเป็นลบแสดงให้เห็นว่ามีสีเขียว และถ้ามีค่าเป็นบวกจะแสดงว่ามีสีแดง

ค่า b เป็นค่าที่แสดงสีเหลืองและสีน้ำเงิน ถ้ามีค่าเป็นลบแสดงให้เห็นว่ามีสีน้ำเงินและถ้ามีค่าเป็นบวกจะแสดงว่ามีสีเหลือง

1.3.2 การประเมินพื้นที่สีแดงของเปลือกผล

ประเมินพื้นที่สีแดงของเปลือกผลด้วยสายตา โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ที่มีสีแดงที่ปรากฏบนเปลือกผลต่อพื้นที่เปลือกผลทั้งหมด

2. การเปลี่ยนแปลงปริมาณรงควัตถุแอนโทไซยานินทั้งหมด

การสกัดและหาปริมาณรงควัตถุแอนโทไซยานินทั้งหมดโดยใช้ estimation of total anthocyanin method (Ranganna , 1977) โดยนำเปลือกผลหนัก 5 กรัมมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วแช่ในสารละลาย ethanolic HCl ปริมาตร 25 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายที่สกัดได้มากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วยสารละลาย ethanolic HCl จากนั้นนำไปวัดค่า absorbance (OD) ที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Spectronic 21โดยใช้ ethanolic HCl เป็น blank นำค่า OD ที่อ่านได้ไปคำนวณเพื่อหาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดมีหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อ100กรัมน้ำหนักสด (mg / 100g fresh weight) โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

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

$$\text{Total anthocyanin} = \frac{\text{total absorbance}}{98}$$

3. การเปลี่ยนแปลงแอคติวิตีของเอนไซม์ PAL

การสกัดและวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ PAL ดัดแปลงจากวิธีการของ Faragher and Chalmers (1977) และ Arakawa *et al.* (1986) โดยมี 3 ขั้นตอนดังนี้

3.1 การสกัดเอนไซม์ PAL (extraction of PAL)

ทำการสกัดเอนไซม์ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยการบดและสกัดเปลือกผลหนัก 5 กรัมด้วยสารละลายสกัด 20 มิลลิลิตรซึ่งประกอบด้วย 0.1 M borate buffer (pH 8.8) 14 mM mercaptoethanol และ10% polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) นาน 15 นาที แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ภายหลังการปั่นนำเฉพาะของเหลว

(supernatant)ไปปั่นอีกครั้งด้วยเครื่องปั่นความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ภายหลังการปั่นนำเฉพาะของเหลวซึ่งเป็น crude enzyme ไปใช้ในการวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์ในขั้นตอนต่อไป

3.2 การวิเคราะห์เอนไซม์ (enzyme assay)

เตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย 40 mM phenylalanine 1 มิลลิลิตร และ 0.1 M borate buffer (pH 7) 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติม crude enzyme 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบที่มีสารละลายวิเคราะห์ดังกล่าว (ชุดควบคุมเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตรแทน crude enzyme) ปริมาตรรวมทั้งหมดเท่ากับ 4 มิลลิลิตร วางหลอดทดสอบนี้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 2 N perchloric acid 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดสอบนี้แล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 องศาเซลเซียส) ภายหลังการปั่นนำเฉพาะของเหลว (supernatant) ไปวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV - spectrophotometer

3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

นำ crude enzyme ที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ Lowry *et al.* (1951) โดยปิเปต crude enzyme ที่ทำให้เจือจางลง 100 เท่า ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบที่มี alkaline copper solution 2.5 มิลลิลิตร (สารละลายนี้ประกอบด้วย 4% Na_2CO_3 : 0.2 N NaOH : 1%$CuSO_4 \cdot 5H_2O$: 2% potassium tartrate ในอัตราส่วน 5 : 5 : 0.1 : 0.1) วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที ต่อจากนั้นเติม 50% phenol reagent 0.25 มิลลิลิตรลงในหลอดทดสอบนี้ วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วนำสารละลายผสมที่ได้นี้ไปวัดหาค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV - spectrophotometer โดยปริมาณโปรตีนที่ได้มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด (mg / 100g fresh weight)

ในการทดลองนี้ นำค่าที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.2 และ 3.3 มาคำนวณค่าแอคติวิตีเอนไซม์ PAL ซึ่งมีหน่วยเป็น n mole / mg protein • hr

4. การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Nelson ' s reducing sugar (อารี , 2530 อ้างโดย พนารัตน์ , 2533) โดยนำเปลือกผลมะม่วงที่ผ่านการอบให้แห้งสนิทที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งบดละเอียดแล้วมา 0.05 กรัมใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มี 50% ethanol 20 มิลลิลิตร ปิดปากขวด

กระดาษอลูมิเนียม นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยเขย่าขวดทุก ๆ 30 นาทีเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ระหว่างเอธานอลกับน้ำตาล หลังจากนั้นนำออกมาวางทิ้งไว้ให้เย็นแล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ปรับปริมาตรของสารละลายที่ได้ด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Nelson ' s reducing sugar โดยวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectronic 21 นำค่า OD ที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยเทียบจากสมการกลูโคสมาตรฐานมีหน่วยเป็นมิลลิกรัมของกลูโคสต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (mg / g dry weight)

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญโตของพืชบางชนิดต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ PAL และปริมาณของรงควัตถุแอนโทไซยานินในเปลือกผลมะม่วงพันธุ์เคนท์

ในการทดลองนี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อย คือ

การทดลองที่ 2.1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในสภาพ *in vivo*

คัดเลือกผลมะม่วงที่มีอายุ 60 วันหลังจากดอกบานจากต้นมะม่วงดังกล่าวข้างต้น เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชบางชนิดต่อการเปลี่ยนแปลงแอคติวิตีของเอนไซม์ PAL และปริมาณรงควัตถุแอนโทไซยานิน โดยเมื่อผลที่อยู่บนต้นมีอายุ 60 วันหลังดอกบาน ทำการจัดให้ผลดังกล่าวได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกัน 5 กรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 น้ำกลั่น (ชุดควบคุม)
กรรมวิธีที่ 2 สารละลาย abscisic acid ความเข้มข้น 100 ppm
กรรมวิธีที่ 3 สารละลาย abscisic acid ความเข้มข้น 200 ppm
กรรมวิธีที่ 4 สารละลาย ethephon ความเข้มข้น 100 ppm
กรรมวิธีที่ 5 สารละลาย ethephon ความเข้มข้น 200 ppm

หมายเหตุ ในแต่ละกรรมวิธีเติม Tritron® - X 0.1 %

โดยในแต่ละกรรมวิธีจะทำการจุ่มผลลงในสารละลายดังกล่าวเป็นเวลานานประมาณ 3 วินาที สุ่มเก็บตัวอย่างผลจากต้นทั้ง 5 กรรมวิธีทุกๆ 5 วันตั้งแต่วันที่เริ่มการทดลองคือ 60 วันหลังดอกบานจนกระทั่งถึงวันที่ผลสุกแก่เต็มที่คือ 115 วันหลังจากดอกบาน รวมจำนวน 12 ครั้ง โดยในแต่ละกรรมวิธีและแต่ละระยะเวลาจะเก็บตัวอย่างเพื่อมาวิเคราะห์จำนวน 10 ซ้ำ (ผล) รวมผลมะม่วงที่ต้องนำมาวิเคราะห์ทั้งหมดประมาณ 500 ผล โดยนำตัวอย่างผลในแต่ละระยะเวลาต่างๆ มาศึกษาและวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 2.2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชบางชนิดในสภาพ *in vitro*

การทดลองนี้ใช้ผลมะม่วงที่ปราศจากการให้สารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีอายุประมาณ 80 - 85 วันหลังวันดอกบาน โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างผลที่มีอายุดังกล่าวข้างต้นจากต้นมาแล้วทำการสกัด crude enzyme จากเปลือกผลด้วยวิธีการดังกล่าวข้างต้นในการทดลองที่ 1 จากนั้นนำ crude enzyme ไปวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ในขั้นตอนที่ 2 และ 3 ตามลำดับ โดยในขั้นตอนที่ 2 นี้มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชแตกต่างกันทั้งชนิดและระดับความเข้มข้นลงไป โดยเติมในปริมาตร 250 โมโครลิตร ลงในสารละลายวิเคราะห์ดังกล่าว ซึ่งแบ่งออกเป็น 5 กรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 สารละลาย NAA ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0 50 100 200 และ 400 ppm

กรรมวิธีที่ 2 สารละลาย GA_3 ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0 50 100 200 และ 400 ppm

กรรมวิธีที่ 3 สารละลาย ethephon ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0 50 100 200 และ400 ppm

กรรมวิธีที่ 4 สารละลาย ABA ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0 50 100 200 และ400 ppm

กรรมวิธีที่ 5 สารละลาย BA ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0 50 100 200 และ 400 ppm

บันทึกผลและเปรียบเทียบผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชดังกล่าวต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ PAL ในสภาพหลอดทดลอง

นำข้อมูลจากการทดลองที่ 1 และ 2 มาวิเคราะห์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงแอคติวิตีของเอนไซม์ PAL และปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในช่วงการพัฒนาของผลและในสภาพที่ได้รับแสงและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชแตกต่างกัน รวมทั้งวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์กับปริมาณแอนโทไซยานินในช่วงที่มีการพัฒนาสีแดงของเปลือกผลของมะม่วงโดยใช้โปรแกรม SPSS (regression analysis)

สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

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

ระยะเวลาดำเนินงานวิจัย

ตั้งแต่ มีนาคม พ.ศ. 2541 ถึง กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2543