บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. พืชทดลอง

ต้นลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย และพันธุ์จักรพรรดิ อายุ 5 ปี ปลูกที่ระดับความสูง 780 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล ต.โป่งแยง อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ โดยต้นลิ้นจี่ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้รับการตัดแต่งกิ่ง และดูแลรักษาต้นเป็นอย่างดี โดยบำรุงรักษาพืชทดลอง ด้วยการพ่นสารเคมีกำจัดศัตรูพืช และให้ปุ๋ยเคมีสูตร 46-0-0 และ 15-15-15 อัตรา 1:1 ร่วมกับปุ๋ยมูลสัตว์ ในช่วงที่พืชแตกใบอ่อน รวมทั้งพ่นธาตุอาหารรองเมื่อใบแก่จัดเพื่อเพิ่มความสมบูรณ์แก่พืชทดลอง

พันธุ์ฮงฮวย

พันธุ์จักรพรรดิ

ภาพที่ 3 ลักษณะต้นลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวยและพันธุ์จักรพรรดิที่ใช้ในการทดลอง

2. อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือใช้ในศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยา

1) Atomic absorption spectrophotometer (Perkin Elmer Ltd., 3100)
2) Compound Microscope (Clympus® BX51, Japan)
3) Freezing Microtome (Leica® CM1850, Germany)
4) Counter (Diamond® Taiwan)
5) Spectrophotometer (Shimadzu® UV-1601, Japan)
6) pH-mater (Suntex®, Taiwan)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7) Hot air oven (Memmert®, Germany)

8) Water bath (Memmert®, Germany)

9) เตาย่อยตัวอย่าง (MS Scientific Instrument®, Thailand)

10) เครื่องบดตัวอย่าง (Mulinex®)

11) Chlorophyll Meter (Konica Minolta, SPAD-502 Plus)

12) Pipette Tip ขนาด 200 1,000 และ5,000 ไมโครลิตร (Rainin LTS® Cylindrical Tips, USA)

13) หลอดย่อยตัวอย่าง ขนาด 250 มิลลิลิตร (Buchi 430, Switzerland)

14) หลอดแก้วทดลอง (test tube)

15) บีกเกอร์ขนาด 50 100 250 และ1,000 มิลลิลิตร

16) ขวดปรับปริมาตร ขนาด 25, 50,100 และ1,000 มิลลิลิตร (ISO LAB®, Germany)

17) ขวดสีชาสำหรับเก็บสารเคมี (Duran®, Germany)

18) เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง (Precica Instruments Ltd, Switzerland)

19) เครื่อง Vortex (Scientifi Industries, USA)

20) Erlenmeyer flask 250 และ 500

21) ไมโครปิเปต ขนาด 200 1,000 และ 5,000 ไมโครลิตร

22) Magnetic bar และ Magnetic stirrer

23) ตะแกรงวางหลอดทดลอง

24) Glass pasteur pipette

25) Cuvette แก้ว (Starna, England) (Pipet lite®, USA)

26) ถุงมือยาง (Sempermed, Thailand)

27) กรวยกรอง

28) กระดาษกรองเบอร์ 5 (Whatman®, England)

29) แผ่นอลูมิเนียม

30) ขวดพลาสติก 60 มิลลิลิตร

31) ช้อนตักสาร

32) แท่งแก้วคนสาร

33) ตู้เย็น

34) Para film (Parafilm , WI 54952)

35) ลูกยางดูดสาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. สารเคมี

1) Ammonium molybdate ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$) (Merck®, 101182)
2) Ammonium sulphate ($(NH_4)_2SO_4$) (Merck®, A 897117.836)
3) Benzoic acid (C_6H_5COOH) (Rankem®, B0180)
4) Copper (II) sulphate ($CuSO_4\cdot 5H_2O$) (Merck®, A 501690)
5) D-Glucose anhydrous ($C_6H_{12}O_6$) (Ajax®, 783)
6) di-Chloroethyliphosphonic acid (ethephon)
7) di-Sodium hydrogen arsenate ($Na_2HAs\cdot 7H_2O$) (Sigma®, S9663)
8) di-Sodium hydrogen phosphate ($Na_2HPO_4\cdot 7H_2O$) (Merck®, 106579)
9) EDTA disodium salt·$2H_2O$ (Rankem®, E0122)
10) Ethanol absolute (Merck®, 100983)
11) Formaline 40% (Gamma®, 99-105)
12) Haematoxylin ($C_{16}H_{14}0_6$)
13) Hydrogen peroxide 30% (H_2O_2) (Merck®, B22287)
14) Hydrochloric acid 37% (HCl) (RCI-labscan®, AR1107-G)
15) Methyl red ($C_{15}H_{15}N_3O_2$) (Rankem®, M0220)
16) Monophotassium phosphate (MKP 0-52-34)
17) Nitric acid 65% AR. (HNO_3) (RCI-Labscan®, A8203)
18) Perchloric acid 70% AR. ($HClO_4$) (QRec®, P1005-1-251)
19) Permount
20) Phenol AR. (C_6H_5OH) (Rankem®, P0130)
21) Potassium dihydrogen Phosphate (KH_2PO_4) (Rankem®, P0320)
22) Potassium sodium (+)-tartrate ($KNaC_4H_4O_6\cdot 4H_2O$) (Fisher®, P/6880/53)
23) Potassium nitrate (KNO_3) (Rankem®, P0513)
24) Sulfuric acid 95-97% (H_2SO_4) (Merck®, 100731)
25) Sodium nitroprusside AR. ($Na_2[Fe(CN)_5NO]\cdot 2H_2O$) (Ajax®, 494)
26) Sodium hypochlorite 10% (NaClO)
27) Sodium chloride AR. (NaCl) (RCI-Labscan®, AR·1166-P)
28) Stanous chloride ($SnCl_2\cdot 2H_2O$) (Fisher®, T/1654/50)
29) Sodium hydroxide (NaOH) (Merck®, 1064988)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

30) Sodium sulfate anhydrous (Na_2SO_4) (Rankem®, S0415)

31) Sodium carbonate anhydrous (Na_2CO_3) (Ajax®, 463)

32) Sodium bicarbonate (Na_2HCO_3) (Merck®, 106329)

33) Tri-Sodium orthophosphate ($Na_3PO_4{\cdot}12H_2O$) (Ajax®, 2220)

34) Tissue freezing medium (Jung®, 08838; VWR®, 0361603E)

35) Xylene (J.T.Baker®,1330-20-7)

4. วิธีการทดลอง

คัดเลือกต้นลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย และพันธุ์จักรพรรดิ อายุ 5 ปี ที่ปลูกอยู่ที่ระดับความสูง 780 เมตรเหนือระดับน้ำทะเลปานกลาง จำนวนสายพันธุ์ละ 5 ต้น ทำการวางแผนการทดลองแบบ 2x4 Factorial in RCBD โดยกำหนดให้พันธุ์เป็นบล็อก (พันธุ์ฮงฮวยและพันธุ์จักรพรรดิ เป็น 1 บล็อก) จำนวน 5 บล็อก ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ดังนี้

ปัจจัยที่ 1 พันธุ์ลิ้นจี่จำนวน 2 พันธุ์

1) พันธุ์ฮงฮวย

2) พันธุ์จักรพรรดิ

ปัจจัยที่ 2 วิธีการจัดการต้นพืช แบ่งเป็น 4 วิธีการ

วิธีที่ 1 กรรมวิธีควบคุม (control)

วิธีที่ 2 ควั่นกิ่ง

วิธีที่ 3 พ่นทางใบด้วยปุ๋ย 0-52-34 ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ผสมเอทิฟอน 400 สตล.

วิธีที่ 4 ควั่นกิ่งร่วมกับพ่นทางใบด้วยปุ๋ย 0-52-34 ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ผสมเอทิฟอน 400 สตล.

ทำการควั่นกิ่ง (วันที่ 25 ตุลาคม 2552) โดยเลือกกิ่งที่แยกจากกิ่งหลักจำนวน 1 กิ่ง และมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 – 5 นิ้ว ใช้เลื่อยโค้งเลื่อยกิ่งให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.0 มิลลิเมตร ให้ฟันเลื่อยทะลุเปลือกไปถึงเนื้อเยื่อเจริญเท่านั้น จากนั้น 15 วันหลังควั่นกิ่ง ทำการพ่นทางใบด้วยปุ๋ยใบ 0-52-34 ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ผสมเอทิฟอน 400 สตล. จำนวน 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 5 วัน บำรุงรักษาพืชทดลองโดยพ่นสารเคมีกำจัดศัตรูพืช และให้ปุ๋ยเคมีร่วมกับปุ๋ยคอกในช่วงที่พืชแตกใบอ่อน รวมทั้งพ่นธาตุอาหารรอง เมื่อใบแก่จัดเพื่อเพิ่มความสมบูรณ์แก่พืชทดลอง ก่อนเริ่มทำการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1) ขั้นตอนเตรียมต้นลิ้นจี่ให้พร้อมก่อนทำการทดลอง โดยการตัดแต่งต้นลิ้นจี่ เปิดกลางทรงพุ่มให้โล่ง บำรุงต้นโดยใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 และ 15-15-15 อัตรา 1:1 ร่วมกับปุ๋ยมูลสัตว์

2) ทั้งสองพันธุ์จะแตกใบอ่อนจำนวน 2 ชุด (วันที่ 11 ตุลาคม 2552)

3) เมื่อใบอ่อนชุดที่ 2 อยู่ในระยะใบเพสลาด ทำการควั่นกิ่งบริเวณกิ่งที่แยกจากกิ่งหลัก (วันที่ 25 ตุลาคม 2552)

4) จากนั้น 15 วัน ทำการพ่นปุ๋ยทางใบด้วย 0-52-34 1% + เอทิฟอน 400 สตล. จำนวน 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 5 วัน (วันที่ 9 พฤศจิกายน 2552) และปล่อยให้พืชทดลองออกดอก

ภาพที่ 4 ขั้นตอนการดำเนินการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การบันทึกข้อมูล

5.1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ

1) พฤติกรรมการเจริญเติบโตของตายอด

สังเกตพฤติกรรมการเปลี่ยนแปลงของตายอดตั้งแต่วันที่ เริ่มทำการควั่นกิ่ง (25 ตุลาคม 2552) และพ่นปุ๋ยทางใบด้วย 0-52-34 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับเอทิฟอน 400 สตล. เมื่อวันที่ 9 14 และ 19 พฤศจิกายน 2552 จนกระทั่งแทงช่อดอก โดยบันทึกวันที่ออกดอก

ภาพที่ 5 ลักษณะการแทงช่อดอกของลิ้นจี่

2) เปอร์เซ็นต์การออกดอก

เมื่อต้นลิ้นจี่เริ่มแทงช่อดอก ทำการพ่นไทโอยูเรียเพื่อกระตุ้นให้แตกยอดใหม่อย่างสม่ำเสมอ จากนั้นทำการนับจำนวนช่อดอก แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การออกดอก ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การออกดอก} = \frac{\text{จำนวนยอดที่ออกดอกต่อต้น}}{\text{จำนวนยอดทั้งหมดต่อต้น}} \times 100$$

3) จำนวนดอกต่อช่อ และเพศดอก

ทำการสุ่มช่อดอกจำนวน 5 ช่อต่อต้น โดยใช้ถุงตาข่ายที่จัดทำขึ้นเอง เพื่อง่ายต่อการนับจำนวนดอกต่อช่อ และการจำแนกเพศดอก (ดอกเพศผู้ และดอกสมบูรณ์เพศ) แล้วคำนวณแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์ ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ดอกเพศผู้} = \frac{\text{จำนวนดอกเพศผู้ต่อช่อ}}{\text{จำนวนดอกทั้งหมดต่อช่อ}} \times 100$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์ดอกสมบูรณ์เพศ} = \frac{\text{จำนวนดอกสมบูรณ์เพศต่อช่อ}}{\text{จำนวนดอกทั้งหมดต่อช่อ}} \times 100$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4) **ขนาดของช่อดอก**

ทำการวัดความกว้างและยาวของช่อดอกลิ้นจี่ โดยวัดส่วนที่กว้างที่สุด และยาวที่สุดของช่อดอก ดังภาพที่ 6

ภาพที่ 6 การวัดขนาดช่อดอกด้านที่กว้างที่สุดและยาวที่สุดของช่อดอก

5) **เปอร์เซ็นต์การติดผล**

เมื่อช่อดอกลิ้นจี่เริ่มติดผลหมดทั้งช่อแล้ว ทำการนับจำนวนผลต่อช่อ แล้วคำนวณแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยใช้ฐานจากดอกสมบูรณ์เพศ ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การติดผล} = \frac{\text{จำนวนผลต่อช่อ}}{\text{จำนวนดอกสมบูรณ์เพศต่อช่อ}} \times 100$$

5.2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา

ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของต้นลิ้นจี่ในช่วงก่อนการออกดอก โดยเก็บตัวอย่างพืช (ตายอดและใบ) ทุก 10 วัน นับจากวันที่ควั่นกิ่ง เมื่อวันที่ 25 ตุลาคม 2552 จนกระทั่งแทงช่อดอก

1) **การพัฒนาของตาบริเวณปลายยอด** โดยดัดแปลงวิธีการของ Johansen (1940)

ตัดยอดลิ้นจี่ยาวประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร และแช่ในน้ำยารักษาสภาพ (Formalin-acetic acid alcohol ; FAA) ทันที เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของตายอดโดยวิธี frozen section จากนั้นนำชิ้นส่วนของปลายยอดฝังลงใน medium (tissue freezing medium) เพื่อยึดเนื้อเยื่อ นำไปตัดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่อง freezing microtome แล้วนำไปย้อมสี Delafield's hematoxylin ปิด cover slip บนกระจกสไลด์โดยใช้ permount บันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 7 ลักษณะปลายยอดที่เก็บมาศึกษา และเครื่อง freezing microtome

2) กิจกรรมของคลอโรฟิลล์ในใบ

2.1) กิจกรรมของคลอโรฟิลล์ในใบ

ทำการวัดกิจกรรมของคลอโรฟิลล์ในใบลิ้นจี่ทุก 10 วัน ตั้งแต่วันที่ควั่นกิ่งจนกระทั่งแทงช่อดอก โดยใช้เครื่อง Chlorophyll Meter (Konica Minolta, SPAD-502 Plus) โดยทำการสุ่มวัดใบลิ้นจี่คู่ที่ 1 หรือ 2 นับจากปลายยอด

ภาพที่ 8 การวัดกิจกรรมของคลอโรฟิลล์ในใบด้วยเครื่อง Chlorophyll Meter (Konica Minolta, SPAD-502 Plus)

2.2) การเปลี่ยนแปลงปริมาณคลอโรฟิลล์

เก็บตัวอย่างใบลิ้นจี่ที่ใช้วัดกิจกรรมของคลอโรฟิลล์ในใบมาหั่นให้ละเอียด เพื่อวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบ ทำการชั่งใบลิ้นจี่ที่หั่นละเอียดแล้ว 0.05 กรัม แช่ในอะซีโตน 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิทแล้วเขย่า เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวช่วงคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ a b และ Total Chlorophyll ดังสมการต่อไปนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$$\text{ปริมาณ Chlorophyll a} = \frac{(12.7 \times D663 - 2.69 \times D645) \times V(ml)}{(1{,}000 \times gfw)}$$

$$\text{ปริมาณ Chlorophyll b} = \frac{(22.9 \times D645 - 4.68 \times D663) \times V(ml)}{(1{,}000 \times gfw)}$$

$$\text{ปริมาณ Total Chlorophyll} = \frac{(20.2 \times D645 + 8.02 \times D663) \times V(ml)}{(1{,}000 \times gfw)}$$

เมื่อ D663 = ค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 663 นาโนเมตร

D645 = ค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 645 นาโนเมตร

gfw = gram fresh weight (กรัมน้ำหนักสด)

V = ปริมาตรของสารละลายอะซีโตนที่ใช้ในการสกัด (10 มิลลิลิตร)

3) การศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้างในใบและกิ่งของลิ้นจี่

ทำการเก็บตัวอย่างพืช (ใบและกิ่ง) ทุก 10 วัน โดยนับจากวันที่ควั่นกิ่ง จนกระทั่งแทงช่อดอก นำตัวอย่างพืชมาล้างทำความสะอาด และอบจนแห้งสนิทที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นำไปบดละเอียด จากนั้นเก็บรักษาไว้ในตู้ดูดความชื้น เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

3.1) การสกัด TNC จากตัวอย่างพืชโดยวิธีของ Smith *et.al.* (1964)

ทำการชั่งตัวอย่างใบและกิ่ง 0.05 กรัม เติม 0.2 N H_2SO_4 40 มิลลิลิตร ปิดปากหลอดทดลองด้วยแผ่นอลูมิเนียม เขย่า จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น ปรับ pH ของสารละลาย ให้เป็นกลางด้วย 0.1 1 และ 2 N NaOH 0.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ H_2SO_4 จากนั้น ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นแล้วกรองเพื่อเอาเฉพาะสารละลายด้วยกระดาษกรอง Whatman® เบอร์ 5 เก็บใส่ขวดพลาสติกขนาด 60 มิลลิลิตร เพื่อรอการวิเคราะห์หาปริมาณต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2) วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณ TNC โดยวิธีของ Nelson's reducing sugar procedure (A.O.A.C, 1990)

3.2.1) การเตรียมสารละลาย Nelson's alkaline copper reagent

1. <u>เตรียม Nelson's reagent A โดยละลาย</u>

- anhydrous Na_2CO_3	25	กรัม	ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร
- sodium potassium tartrate	25	กรัม	
- $NaHCO_3$	20	กรัม	
- anhydrous Na_2SO_4	200	กรัม	

2. <u>เตรียม Nelson's reagent B โดยละลาย</u>

- copper sulphate ($CuSO_4 5H_2O$)	15	กรัม	ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 100 มิลลิลิตร
- เติม sulfuric acid เข้มข้น (H_2SO_4 Conc.)	2	หยด	

3. <u>เตรียม Nelson's alkaline copper reagent โดยผสม</u>

- Nelson's reagent A	20	มิลลิลิตร	ให้เข้ากัน (เตรียมแล้วต้องใช้ทันที)
- Nelson's reagent B	0.8	มิลลิลิตร	

4. <u>เตรียม arsenomolybdic acid reagent โดย</u>
   - ละลาย ammonium molybdate ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}4H_2O$) 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร แล้วเติม sulfuric acid เข้มข้น (H_2SO_4 Conc.) 21 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เย็น
   - ละลาย disodium hydrogen arsenate (Na_2Has $7H_2O$) 3 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร
   - นำสารละลายทั้งสองผสมและเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเก็บไว้ในขวดสีชา วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 วัน ก่อนนำมาใช้**สารละลายที่ได้ต้องมีสีเหลืองเท่านั้น**

3.2.2) การเตรียมสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน

การเตรียมสารละลายน้ำตาลมาตรฐานโดยใช้ปิเปตดูดสารละลาย D-glucose เข้มข้น 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 ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จึงจะได้สารละลายกลูโคสมาตรฐาน 0.025 0.05 0.075 0.1 0.125 0.15 0.175 0.2 0.225 และ 0.250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (วิทยา, 2537)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.3) วิธีการวิเคราะห์

1) การเตรียมกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยนำสารละลายน้ำตาลมาตรฐานที่เตรียมไว้ใส่หลอดทดสอบปริมาณ 1 มิลลิลิตร เติม Nelson's alkaline copper reagent ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี แล้วปิดด้วยกระดาษอะลูมิเนียม นำหลอดแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีโดยวางลงในน้ำเย็น เมื่อหลอดเย็นแล้วเติมสารละลาย arsenomolybdic acid หลอดละ 1 มิลลิลิตร เขย่าเพื่อให้ตะกอนของ copper sulfate ($CuSO_4$) ละลายจนหมด เติมน้ำกลั่น 7 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันอีกครั้ง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปอ่านค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (absorbance) โดยใช้ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเขียนเป็นกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของ glucose (แกน X) กับค่า absorbance (แกน Y)

2) การวิเคราะห์ปริมาณ TNC ในตัวอย่างนำสารละลายที่สกัดได้จากตัวอย่างใส่หลอดทดสอบ 1 มิลลิลิตร ทำเช่นเดียวกับการเตรียมกราฟมาตรฐาน นำค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ทำไว้แล้วคำนวณปริมาตรเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ D-glucose ต่อน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง ดังนี้

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

vol make = ปริมาตรสุดท้ายหลังจากปรับ pH ให้เป็นกลาง (50 มิลลิลิตร)
vol take = ปริมาตรของสารละลายที่ใช้ทดสอบค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (1 มิลลิลิตร)
mg glucose equivalent = คำนวณได้มาจากกราฟมาตรฐาน

4) การเปลี่ยนแปลงปริมาณธาตุอาหารในใบ (ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม)

วิธีการเก็บตัวอย่างกระทำเช่นเดียวกับการวิเคราะห์หาคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้าง (ข้อ 3)

4.1) การย่อยตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส (ดัดแปลงโดย Ohyama *et al*., 1985; 1986)

ชั่งตัวอย่างพืชอบแห้งที่บดละเอียด 0.05 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น (H_2SO_4) 1 มิลลิลิตร ปิดหลอดด้วยพาราฟิล์มทิ้งไว้ 1 คืน วันถัดไปนำตัวอย่างมาย่อยที่เตาย่อยตัวอย่าง ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำหลอดทดลองออกมาทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) หลอดละ 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำมาย่อย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ต่อที่อุณหภูมิ 230 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หากสารละลายยังไม่ใสให้เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) หลอดละ 0.3 มิลลิลิตร แล้วนำไปย่อยต่อที่อุณหภูมิ 230 องศาเซลเซียส 30 นาที ทำซ้ำเดิมจนกระทั่งสารละลายใส หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมานำมาปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้ไว้ในขวดพลาสติก ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

4.2) การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนรวมในใบและกิ่งของลิ้นจี่ (Indolphenol Method) (Ohyama *et al*., 1985; 1986)

(1) เตรียมสารละลายที่ใช้ตรวจสอบปริมาณไนโตรเจน จำนวน 4 ชนิด ดังนี้

A reagent : ชั่งโซเดียมคีเลต (EDTA.2Na) 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 10 โดยใช้ 10 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เป็นตัวปรับ pH จากนั้นเติมสารละลายเมทิลเรด (methylred) 20 มิลลิลิตร (เมทิลเรด 0.05 กรัม + 60% เอทานอล 20 มิลลิลิตร) คนให้เข้ากันปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

B reagent : ชั่งโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 136.09 กรัม ใส่บีกเกอร์ 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร จากนั้นชั่งกรดเบนโซอิค (benzoic acid) 2.75 กรัม ใส่บีกเกอร์ 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร นำไปผสมให้เข้ากันโดยใช้ stirrer ที่อุณหภูมิ 30 - 40 องศาเซลเซียส จนละลายหมดนำมารวมกันแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

C reagent : ชั่งโซเดียมไนโตรพลัสไซด์ (sodium nitroprusside) 0.1 กรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) จากนั้นเติมฟีนอล (phenol) 10.25 มิลลิลิตร (นำฟีนอลไปอุ่นที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส จะได้ฟีนอลที่เป็นของเหลว) แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้ได้นาน 2 สัปดาห์

D reagent : ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 10 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.7H_2O$) 7.06 กรัม และไตรโซเดียมฟอสเฟต ($Na_3PO_4.12H_2O$) 31.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นเติมโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ (sodium hyperchlorite) 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

(2) เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1 N (ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 40 กรัม ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร)

(3) เตรียมสารละลายมาตรฐานจากแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ที่ความเข้มข้น 0 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน โดยชั่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.471 กรัม ละลายด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) 0.5 N แล้วปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 1 ลิตร จนครบปริมาตร จะได้สารละลายมาตรฐานไนโตรเจนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำสารละลายไปเจือจางตามความเข้มข้นที่ต้องการ โดยกรดซัลฟูริก 0.5 N เตรียมจากกรดซัลฟูริก 13.32 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

(4) ดูดตัวอย่างที่ย่อยได้จากข้อ 4.1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (ขึ้นกับส่วนและชนิดของพืช) เติม A reagent 0.5 มิลลิลิตร และเติม B reagent 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ สารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู แล้วนำมาไทเทรตโดยหยดโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1 N ลงไป เขย่าเล็กน้อยให้สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง จากนั้นเติม C reagent 2.5 มิลลิลิตร และ D reagent 2.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ 625 นาโนเมตร บันทึกผล แล้วนำค่าที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน จากนั้นนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน (มิลลิกรัมต่อส่วนของพืช) โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างพืช (\%)} = \frac{A \times B \times C}{D \times E \times 1000}$$

สาร A = ค่าความเข้มข้นของไนโตรเจนจากกราฟมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อลิตร)

B = ปริมาตรสุดท้ายในปฏิกิริยา Indolphenol (25 มิลลิลิตร)

C = ปริมาตรสุดท้ายของการย่อยตัวอย่างพืช (50 มิลลิลิตร)

D = น้ำหนักแห้งของตัวอย่างที่ใช้ย่อย (กรัม)

E = ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ (มิลลิลิตร)

4.3) การวิเคราะห์ปริมาณธาตุฟอสฟอรัสโดยการดูดกลืนแสงของสารที่มีสี (colorimetry) (Ohyama *et al*., 1991) ซึ่งได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างฟอสเฟต และอนุมูลโมลิบเดต ดังนี้

A reagent : ชั่ง $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร

(1) เตรียมสารละลายที่ใช้ตรวจสอบปริมาณฟอสฟอรัส (Molybdate reagent) ดังนี้

จากนั้นนำมากรองโดยใช้ ระบบสุญญากาศ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

B reagent : เตรียม H_2SO_4 250 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร โดยค่อยๆเท H_2SO_4 ลงในน้ำกลั่น ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 500 มิลลิลิตร

นำ A reagent มาผสม B reagent โดยเท B reagent ลงในบีกเกอร์ ขนาด 1 ลิตร ค่อยๆ เท A reagent ทีละน้อย ช้าๆ ทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมานำมาปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

(2) เตรียมสารละลาย Stanous chloride โดยชั่ง ($SnCl_2.2H_2O$) 0.25 กรัม (ควรเตรียมในตู้ควัน) โดยเติม HCl 5 มิลลิลิตร ละลายให้หมด จากนั้นเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร (ใช้ได้ 2 วัน)

(3) เตรียมสารละลายมาตรฐานของฟอสฟอรัสจาก KH_2PO_4 ปรับให้มีความเข้มข้นตามลำดับคือ 0 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

(4) ดูดสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการย่อยปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อย เติม Molybdate reagent ขวดละ 1 มิลลิลิตร และสารละลาย Stanous chloride 0.2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ 660 นาโนเมตร นำค่าที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของฟอสฟอรัส จากนั้นนำค่าที่คำนวณหาปริมาณฟอสฟอรัส (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) โดยใช้สูตรคำนวณเช่นเดียวกับการหาปริมาณไนโตรเจน

4.4) การย่อยตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์โพแทสเซียม (Mizukoshi *et al*., 1994)

ชั่งตัวอย่างพืชอบแห้งบดละเอียด 0.05 กรัม เติม $HClO_4$ 0.4 มิลลิลิตร และ HNO_3 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ เขย่าให้เข้ากัน ปิดหลอดด้วยพาราฟิล์ม ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นนำมาย่อยที่ 100 องศาเซลเซียส เพื่อไล่ควันสีเหลืองของ NO_2^- ออกจนหมด จึงปรับเพิ่มอุณหภูมิเป็น 210 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้จนตัวอย่างแห้งเป็นคราบตะกอนสีขาวบริเวณก้นหลอด ระวังอย่าให้ไหม้ นำออกมาทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมสารละลายเจือจางของไฮโดรคลอริก (HCl : H_2O = 1: 4) หลอดละ 1 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากัน จากนั้นนำมาตั้งบนเตาที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อไล่ Cl^- ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำมาปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร เทใส่ขวดพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับวิเคราะห์ต่อไป

4.5) การวิเคราะห์ปริมาณธาตุโพแทสเซียม

(1) เตรียมสารละลายมาตรฐานของโพแทสเซียม ปรับให้มีความเข้มข้น 0 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(2) เจือจางสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการย่อย โดยใช้สารตัวอย่างปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 25 มิลลิลิตร

(3) นำสารละลายดังกล่าวไปวัดปริมาณโพแทสเซียมโดยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 766.5 นาโนเมตร บันทึกผล และนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณโพแทสเซียม (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) โดยใช้สูตรคำนวณเช่นเดียวกับการหาปริมาณไนโตรเจน

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

โดยใช้โปรแกรม Sxw for windows

7. สถานที่ทำการทดลอง

1) แปลงทดลองสาธิตไม้ผลโครงการหลวงแม่สาใหม่ อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่

2) ห้องปฏิบัติการพืชอุตสาหกรรม ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3) ห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาพืชสวน ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

4) ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

8. ระยะเวลาในการทำการทดลอง

ทำการทดลองในช่วงระหว่างเดือนตุลาคม 2552 ถึง เดือนกุมภาพันธ์ 2553

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การบันทึกข้อมูล

พันธุ์ฮงฮวย

พันธุ์จักรพรรดิ

1. การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ

   1.1 วันที่ออกดอก
   1.2 เปอร์เซ็นต์การออกดอก
   1.3 ขนาดช่อดอก
   1.4 จำนวนดอกต่อช่อ
   1.5 เปอร์เซ็นต์เพศดอก
   1.6 เปอร์เซ็นต์การติดผล

2. การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา

   2.1 การศึกษาการพัฒนาของตาบริเวณปลายยอดโดยดัดแปลงจากกรรมวิธีของ Johanson (1940)

   2.2 วัดกิจกรรมของคลอโรฟิลล์ โดย Spad และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ โดยวิธีของ Yoshida *et.al.* (1976)

   เก็บตัวอย่างใบลิ้นจี่ ตั้งแต่วันที่ควั่นกิ่ง ทุก 10 วัน ในวันที่ 0 10 20 30 40 50 60 และ 70 หลังการควั่นกิ่ง ทุกกรรมวิธี

   2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้าง ในใบและกิ่ง โดยวิธีของ Smith *et.al.* (1964) และ A.O.A.C,

   2.4 การเปลี่ยนแปลงระดับธาตุอาหาร N P และ K ในใบ โดยวิธีของ Ohyama *et.al.* (1985; 1986)และ Mizukoshi

ภาพที่ 8 ขั้นตอนการบันทึกข้อมูลการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและสรีรวิทยา โดยการควั่นกิ่งและการพ่นปุ๋ยทางใบร่วมกับเอทิฟอนต่อการออกดอกของลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวยและจักรพรรดิ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved