บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. พืชทดลอง

ต้นลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย (*Litchi chinennsis* Sonn. CV. Hong Huay) อายุ 15 ปี ปลูกที่ระดับความสูง 1,200 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล ณ แปลงเกษตรกรบ้านแม่สาใหม่ ต.โป่งแยง อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ โดยต้นลิ้นจี่ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้รับการตัดแต่งกิ่ง และดูแลรักษาต้นเป็นอย่างดี

2. อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

2.1 เครื่องมือใช้ในศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยา

1) Datalogger (Delta-t Devices Ltd., England)
2) LCA-4 Portable Photosynthesis and Transpiration Measurement System (ADC®, England)
3) Chlorophyll Fluorescence (Hansatech Instrument Ltd., England)
4) Atomic absorption spectrophotometer (Perkin Elmer Ltd., 3100)
5) Digital Verneercaliper ขนาด 0-150 มิลลิเมตร
6) Compound Microscope (Clympus® BX51, Japan)
7) Freezing Microtome (Leica® CM1850, Germany)
8) Liquid Scintillation Counter (Phillip® PW4700)
9) Digital refractometer (ATAGO® PR32, Japan)
10) Colorimeter (Minolta® CR-10)
11) Spectrophotometer (Shimadzu® UV-1601, Japan)
12) Rotary eveporator (Heidolph® FL 1703, Germany)
13) Refrigerated Centifuge (Heraeus Sepaleeh® Megatuge 1.0R; Suprafuge 22, USA)
14) C18 Sep-Pak cartridge (Waters® Eschborn, Irelaud)
15) pH-mater (Sartorius Professional Meter® PP-50, Taiwan)
16) Vaccum concentrator (Savant Speed Vac®Plus)
17) Hot air oven (Memmert®, Germany)
18) Water bath (Memmert®, Germany)
19) เตาย่อยตัวอย่าง (MS Scientific Instrument®, Thailand)
20) Freeze dryer (Dura-Stop®, USA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

21) GA-glassinter filters ขนาด 10-16 ไมโครเมตร (ROBU® 20304, Germany)
22) เครื่องบดตัวอย่าง (IKA®A11 basic), โกร่งบดตัวอย่าง และเครื่องปั่นแยกกาก (Mulinex®)
23) Desicator
24) ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส

2.2 เครื่องแก้ว และอุปกรณ์

3. สารเคมี

1) Acetic acid glacial (CH_3COOH) (Lab-Scan®, A 8401)
2) Ammonium acetate (CH_3COONH_4) (Merck®, 1.01116.1000)
3) Ammonium dihydrogen phosphate ($NH_4H_2PO_4$)
4) Ammonium molybdate ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$) (Merck®, 101182)
5) Ammonium nitrate (NH_4NO_3)
6) Ammonium sulphate ($(NH_4)_2SO_4$) (Merck®, A 897117.836)
7) Benzoic acid (C_6H_5COOH) (Rankem®, B0180)
8) Copper (II) sulphate ($CuSO_4\cdot 5H_2O$) (Merck®, A 501690)
9) DEAE-Sephadex-A25 (Sigma-Aldrich® Swedeu, 027K0693)
10) Deionized distill water 1 M
11) D-Glucose anhydrous ($C_6H_{12}O_6$) (Ajax®, 783)
12) di-Potassium hydrogen orthophosphate (K_2HPO_4) (Rankem®, 0246)
13) di-Sodium hydrogen arsenate ($Na_2HAs\cdot 7H_2O$) (Sigma®, S9663)
14) di-Ethyl ether (Lab-scan®, A3509S)
15) di-Sodium hydrogen phosphate ($Na_2HPO_4\cdot 7H_2O$) (Merck®, 106579)
16) di-Chloroethyliphosphonic acid (ethephon)
17) (Trimethylsily) diazonemethane ($C_4H_{10}N_2Si$) (Sigma-Aldrich®, 362832)
18) EDTA disodium salt$\cdot 2H_2O$ (Rankem®, E0122)
19) Ethanol absolute (Merck®, 100983)
20) Formaline 40% (Gamma®, 99-105)
21) Haematoxylin ($C_{16}H_{14}0_6$)
22) Hydrogen peroxide 30% (H_2O_2) (Merck®, B22287)
23) Hydrochloric acid 37% (HCl) (RCI-labscan®, AR1107-G)
24) Lantanum oxide (Ajax®, 1539)
25) Liquid Scintillator (Quicksint 2000, Zinseer analytic®, 27144)
26) Liquid Nitrogen

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

27) Methanol (CH_3OH) (RCI-Labscan®, A3513)

28) Methyl red ($C_{15}H_{15}N_3O_2$) (Rankem®, M0220)

29) Monophotassium phosphate (MPK 0-52-34)

30) Nitric acid 65% AR. (HNO_3) (RCI-Labscan®, A8203)

31) Perchloric acid 70% AR. ($HClO_4$) (QRec®, P1005-1-251)

32) Permount

33) Phenolphthalein Indicator powder (Rankem®, P015)

34) Phenol AR. (C_6H_5OH) (Rankem®, P0130)

35) Potassium dihydrogen Phosphate (KH_2PO_4) (Rankem®, P0320)

36) Potassium sodium (+)-tartrate ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$) (Fisher®, P/6880/53)

37) Poly (vinylpolypypyrrolidene) (PVP) (Sigma®, USA, 038K0673)

38) Potassium chloride (KCl) (Rankem®, P0240)

39) Potassium nitrate (KNO_3) (Rankem®, P0513)

40) Sulfuric acid 95-97% (H_2SO_4) (Merck®, 100731)

41) Sodium nitroprusside AR. ($Na_2[Fe(CN)_5NO] \cdot 2H_2O$) (Ajax®, 494)

42) Sodium hypochlorite 10% (NaClO)

43) Sodium chloride AR. (NaCl) (RCI-Labscan®, AR·1166-P)

44) Stanous chloride ($SnCl_2 \cdot 2H_2O$) (Fisher®, T/1654/50)

45) Sodium hydroxide (NaOH) (Merck®, 1064988)

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

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

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

49) tri-Sodium orthophosphate ($Na_3PO_4 \cdot 2H_2O$) (Ajax®, 2220)

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

51) Xylene (J.T.Baker®,1330-20-7)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. วิธีการทดลอง

คัดเลือกต้นลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวยอายุ 15 ปี ที่ปลูกที่ระดับความสูง 1,200 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล จำนวน 16 ต้น ณ แปลงเกษตรกรบ้านแม่สาใหม่ ต.โป่งแยง อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ เตรียมต้นลิ้นจี่ที่ใช้ในการทดลองดังตารางที่ 6 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD: Completely Randomized Design) ประกอบด้วย 4 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ โดยให้ 1 ต้น เป็น 1 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม

กรรมวิธีที่ 2 ควั่นกิ่ง

กรรมวิธีที่ 3 พ่นปุ๋ยทางใบด้วย 0-52-34 1% ผสมกับเอทิฟอน 800 ส่วนต่อล้าน

กรรมวิธีที่ 4 ควั่นกิ่งร่วมกับพ่นปุ๋ยทางใบด้วย 0-52-34 1% ผสมกับเอทิฟอน 800 ส่วนต่อล้าน

ทำการควั่นกิ่งในช่วงที่ใบอ่อนชุดที่ 2 เข้าสู่ระยะใบเพสลาด (26 มิถุนายน 2551) โดยเลือกกิ่งที่แตกออกมาจากกิ่งหลัก (limb) ที่มีส่วนกลมมากที่สุด ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10–20 เซนติเมตร ใช้เลื่อยโค้งเลื่อยกิ่งให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.0 มิลลิเมตร ให้ฟันเลื่อยทะลุเปลือกไปถึงเนื้อเยื่อเจริญเท่านั้น จากนั้น 15 วันหลังควั่นกิ่ง ทำการพ่นปุ๋ยทางใบด้วย 0-52-34 ความเข้มข้น 1% ผสมกับเอทิฟอน 800 ส่วนต่อล้าน จำนวน 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน

การตัดแต่งต้นลิ้นจี่โดยเปิดกลางทรงพุ่มให้โล่ง

เมื่อใบชุดที่ 2 เริ่มผลิใบใหม่ ทำการเปิดโคนต้น

ระยะใบเพสลาด

ทำการควั่นกิ่งบริเวณกิ่งที่แยกจากกิ่งหลัก

15 วันหลังควั่นกิ่ง

ทำการพ่นปุ๋ยทางใบด้วย 1% 0-52-34 +เอทิฟอน 800 สตล. จำนวน 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 5 วัน

ปล่อยให้พืชออกดอก

ภาพที่ 6 ขั้นตอนการดำเนินการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 การดูแลรักษาพืชทดลองตามระยะพัฒนาการของต้นพืช

พฤติกรรมของพืชและการดูแลรักษา	พ.ศ. 2550			พ.ศ. 2551											
	ตค	พย	ธค	มค	กพ	มีค	เมย	พค	มิย	กค	สค	กย	ตค	พย	ธค
<u>การดูแลรักษา</u>															
• ตัดแต่งกิ่ง (50-70%)		1													
• พ่น Thiourea (100กรัม/น้ำ 20ลิตร)			25		22				30						
• ให้น้ำ (7 วัน/ครั้ง)			10	◄	► 23										
• ใส่ปุ๋ยเคมี (46-0-0,15-15-15 อย่างละ 500กรัม/ต้น)		1			10										
• ใส่ปุ๋ยคอก (มูลวัว,อัตรา 15 กิโลกรัม/ต้น)		1			10										
• พ่นธาตุอาหารรอง (อัตรา 10 กรัม/น้ำ 20 ลิตร)			25			22									
• พ่นสารเคมีเกษตร ป้องกันกำจัดโรคและแมลงโดยเฉพาะอย่างยิ่งป้องกันการระบาดของเพลี้ยไฟในช่วงแตกใบอ่อน และแทงช่อดอกเช่น คาร์บาริล			25			22			30	7	6				
• ควั่นกิ่ง							26								
• แตกใบอ่อนครั้งที่1			25												
• แตกใบอ่อนครั้งที่2					22										
• เริ่มแทงช่อดอก									26						
• ออกดอก-ดอกบาน									28	◄ ► 31					
• ระยะติดผล											6	◄		► 26	
• เก็บเกี่ยวผลผลิต														26	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การบันทึกข้อมูล

5.1 ข้อมูลทางกายภาพ

ได้แก่ ข้อมูลสภาพภูมิอากาศในช่วงทำการทดลอง เปอร์เซ็นต์การแตกใบอ่อน เปอร์เซ็นต์การออกดอก ขนาดช่อดอก เปอร์เซ็นต์เพศดอก เปอร์เซ็นต์การติดผล เมื่อผลลิ้นจี่มีอายุ 1 เดือนหลังติดผล เริ่มทำการวัดการเจริญเติบโตของผลจนถึงระยะเก็บเกี่ยว (เปลือกผลลิ้นจี่เปลี่ยนเป็นสีแดงอมชมพู) จากนั้นเก็บเกี่ยวผลผลิตและนำผลลิ้นจี่มาตรวจสอบคุณภาพ

ภาพที่ 7 การตรวจนับจำนวนช่อดอกต่อพื้นที่ 1 ตารางเมตรโดยใช้กรอบที่จัดทำขึ้น

ภาพที่ 8 ลักษณะดอกกระเทยที่ทำหน้าที่เป็นดอกเพศเมีย (ก) ดอกกระเทยที่ทำหน้าที่เป็นดอกเพศผู้ (ข) และผลอายุ 4 สัปดาห์ (ค)

5.2 การศึกษาการพัฒนาของตาบริเวณปลายยอด

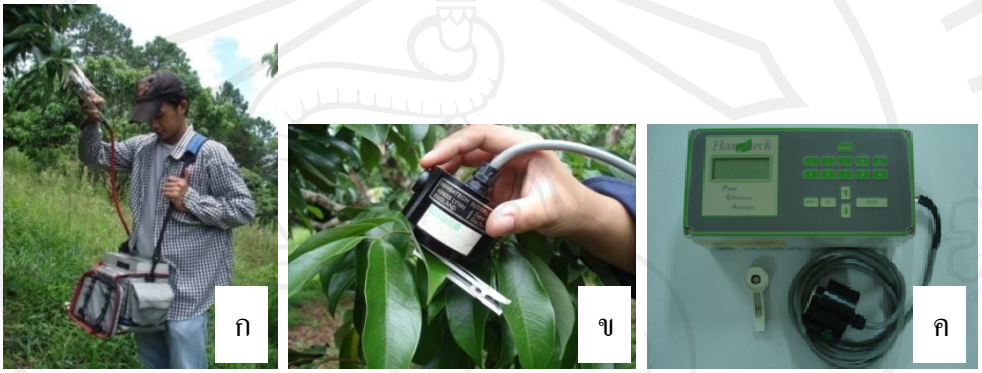
เก็บตัวอย่างปลายยอดลิ้นจี่ ทุก 14 วัน คือ ในวันที่ 0, 7, 21, 35, 49, 56 และ 63 หลังการควั่นกิ่ง โดยตัดยอดลิ้นจี่ยาวประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร และแช่ในน้ำยารักษาสภาพ (Formalin-acetic acid alcohol ; FAA) ทันที เพื่อใช้ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของตายอดโดยวิธี frozen section โดยดัดแปลงจากกรรมวิธีของ Johanson (1940) นำชิ้นส่วนปลายยอดฝังลงในน้ำยา (tissue freezing medium) เพื่อยึดเนื้อเยื่อ นำไปตัดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่อง freezing microtome นำไปย้อมสี Delafield's hematoxylin ปิด cover slip บนกระจกสไลด์โดยใช้ permount บันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.3 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา

5.3.1 วัดอัตราการสังเคราะห์แสง ค่าประสิทธิภาพของปากใบ และอัตราการคายน้ำของใบ

โดยใช้เครื่อง Portable Photo System รุ่น LCA-4 และวัดประสิทธิภาพการทำงานของคลอโรฟิลล์ของใบพืชด้วยเครื่อง Chlorophyll Fluorescence โดยทำการสุ่มวัดใบที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่ ต้นละ 4 คู่ใบ 4 ทิศทางรอบทรงพุ่ม และทำการวัดในช่วงเวลา 10.00-12.00 น. ในวันที่ 0, 7, 21, 35, 49, 56 และ 63 หลังการควั่นกิ่ง



ภาพที่ 9 การวัดอัตราการสังเคราะห์แสง ค่าประสิทธิภาพของปากใบ อัตราการคายน้ำของใบโดยเครื่อง Portable Photo System รุ่น LCA-4 (ก) และการวัดประสิทธิภาพการทำงานของคลอโรฟิลล์ของใบพืชด้วยเครื่อง Chlorophyll Fluorescence (ข และ ค)

5.3.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคาร์โบไฮเดรต และปริมาณธาตุอาหารในใบ

1) เก็บตัวอย่างใบ เนื้อไม้ และเปลือกกิ่งไม้ของกิ่งลิ้นจี่ ช่วงสุดท้ายที่จะพัฒนาเป็นช่อดอก ในวันที่ 0, 7, 21, 35, 49, 56 และ 63 หลังการควั่นกิ่ง นำตัวอย่างพืชไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้าง และปริมาณธาตุอาหารหลักของพืช

2) การวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้าง (Total nonstructural carbohydrate; TNC)

วิธีการสกัด TNC จากตัวอย่างพืชโดยวิธีของ Smith *et al.* (1964) และดัดแปลงโดยสุจริต (2531)

ทำการชั่งตัวอย่างพืชที่อบแห้งสนิท และบดละเอียดแล้ว 0.05 กรัม เติม 0.2 N H_2SO_4 40 มิลลิลิตร ปิดปากหลอดทดลองด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ แล้วอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็น ปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย 0.1, 1 และ 2 N NaOH และ 0.5 และ5%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

H_2SO_4 ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman® เบอร์ 5 เก็บใส่ขวดพลาสติกขนาด 60 มิลลิลิตร เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

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

ดูดสารสะลายที่สกัดได้จากตัวอย่าง หลอดละ 1 มิลลิลิตร ขึ้นอยู่กับชนิดและส่วนของพืช เติม Nelson's alkaline copper reagent จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าและปิดด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ จากนั้นนำไปแช่ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมสารละลาย arsenomolybdic acid reagent จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ตะกอนของ Cu_2O ละลายจนหมด จากนั้นเติมน้ำกลั่นเพื่อให้ปริมาตรสุดท้ายได้ 10 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าอีกครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำสารละลายไปอ่านคาการดูดกลืนแสง (absorbance) จากเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ทำไว้ แล้วคำนวณเป็นปริมาณมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ D-glucose ต่อน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง

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 และ0.250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (วิทยา, 2537)

3) การวิเคราะห์หาปริมาณธาตุอาหารหลัก

การย่อยตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ไนโตรเจน และฟอสฟอรัสดัดแปลงโดย Ohyama *et al.* (1985; 1986)

ชั่งตัวอย่างพืชอบแห้งบดละเอียด 0.05 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง เติม H_2SO_4 เข้มข้น 1 มิลลิลิตร เทลงในหลอดที่ใส่ตัวอย่างไว้ ปิดหลอดด้วยพาราฟิล์ม ทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมานำมาย่อยที่เตาย่อยตัวอย่างพืช ปรับอุณหภูมิที่ 180 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติม H_2O_2 หลอดละ 0.3 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากัน นำมาย่อยต่อโดยปรับอุณหภูมิเป็น 230 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หากสารละลายยังไม่ใสให้เติม H_2O_2 หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร ทุกๆ 30 นาที ทำซ้ำเดิมจนกระทั่งสารละลายใส หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมานำมาปรับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร แล้วเก็บสารละลายที่ได้ไว้ในขวดพลาสติก เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องสำหรับวิเคราะห์ต่อไป

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

1) เตรียมสารละลายที่ใช้ตรวจสอบปริมาณไนโตรเจน จำนวน 4 ชนิด ดังนี้

A reagent : ชั่ง EDTA.2Na 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับ pH ให้เป็น 10 จากนั้นเติมสารละลาย methyl red 20 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

B reagent : ชั่ง KH_2PO_4 136.09 กรัม และ benzoic acid 2.75 กรัมละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

C reagent : ชั่ง Na_2 (Fe (CN)$_5$ NO)·$2H_2O$ (Sodium nitroprusside) 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นเติมฟีนอล 10.25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็น สารละลายนี้มีอายุการใช้งาน 2 สัปดาห์

D reagent : ชั่ง NaOH 10 กรัม Na2HPO_4·$7H_2O$ 7.06 กรัม และ Na_3PO_4·$12H_2O$ 31.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นเติม NaClO 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

2) เตรียม NaOH เข้มข้น 1 N เพื่อปรับความเป็นด่าง

3) เตรียมสารละลายมาตรฐานจาก $(NH_4)_2SO_2$ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

4) ดูดตัวอย่างที่ย่อยได้ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติม A reagent 0.5 มิลลิลิตร และเติม B reagent 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ นำมาไตเตรทโดยหยด 1 N NaOH ลงไป เขย่าเล็กน้อยให้เปลี่ยนสี จากนั้นเติม C reagent 2.5 มิลลิลิตร และ D reagent 2.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ 625 นาโนเมตร บันทึกผลแล้วนำค่าที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานตามกฎของ Beer's-Lambert's Law จากนั้นนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) โดยใช้สูตรคำนวณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างพืช (\%)} = \frac{A \times B \times C}{1{,}000 \times DW}$$

A = ค่าความเข้มข้นของไนโตรเจนในสารละลายตัวอย่างพืชจากกราฟมาตรฐาน(ppm)

B = อัตราส่วนการเจือจางสารตัวอย่างในปฏิกิริยา Indolphenol

= ปริมาตรสุดท้ายในการวิเคราะห์ (25 มิลลิลิตร)

C = ปริมาตรสุดท้ายของการย่อยตัวอย่างพืช

DW = น้ำหนักแห้งตัวอย่างที่ใช้ย่อย (กรัม)

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

1) เตรียมสารละลายที่ใช้ตรวจสอบปริมาณฟอสฟอรัส จำนวน 3 ชนิด ดังนี้

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

B reagent : เตรียม H_2SO_4 250 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตรทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 500 มิลลิลิตร

C reagent : นำ A reagent มาผสม B reagent โดยเท B reagent ลงในบีกเกอร์ ขนาด 1 มิลลิลิตร ค่อยๆ เท A reagent ทีละน้อย ช้าๆ ทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมานำมาปรับปริมาตรให้เป็น 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาตั้งไว้ในที่มืด

2) เตรียมสารละลายสแตนนัสคลอไรด์ โดยชั่ง $(SnCl_2.2H_2O)$ 0.25 กรัม เทลงในขวดสีชา (ควรเตรียมในตู้ควัน) โดยเติม HCl 5 มิลลิลิตร ละลายให้หมด จากนั้นเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร

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

4) ดูดสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการย่อยปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อย เติม C reagent ขวดละ 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ 660 นาโนเมตร นำค่าที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของฟอสฟอรัส จากนั้นนำค่าที่คำนวณหาปริมาณฟอสฟอรัส (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) โดยใช้สูตรคำนวณเช่นเดียวกับการหาปริมาณไนโตรเจน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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 ทิ้งไว้จนตัวอย่างแห้งระวังอย่าให้ไหม้ นำออกมาทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมสารละลายเจือจางของไฮโดรคลอริก (HCl 1: H_2O 4 มิลลิลิตร) หลอดละ 1 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากัน จากนั้นนำมาตั้งบนเตาที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อไล่ Cl^- ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำมาปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร เทใส่ขวดพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องสำหรับวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณธาตุโพแทสเซียม

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

2) เจือจางสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการย่อย โดยใช้สารตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 25 มิลลิลิตร

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

5.4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณฮอร์โมนพืช

5.4.1 การเก็บตัวอย่าง leaf diffusate

การศึกษาฮอร์โมนพืชในสารลาย leaf diffusate เป็นการศึกษาถึงการเคลื่อนที่ของฮอร์โมนพืชจากใบของแหล่งหนึ่งไปยังอีกแหล่งหนึ่งโดยผ่านท่อลำเลียงอาหาร เก็บใบย่อยลิ้นจี่คู่ใบที่ 1 ของใบประกอบ ในวันที่ 0, 7, 21, 35, 49, 56 และ 63 หลังควั่นกิ่ง จำนวน 2 ใบ จุ่มในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2.5 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืดอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นเก็บรักษาสารละลายบัฟเฟอร์ไว้ที่ เพื่อรอการวิเคราะห์หาปริมาณ IAA และไซโตไคนิน ด้วยวิธี Radioimmunoassay (RIA) (Gurber and Bangerth, 1990)

5.4.2 การเก็บตัวอย่างยอด ใบ เนื้อไม้ และเปลือกกิ่งไม้ของลิ้นจี่ ในวันที่ 0, 7, 21, 35, 49, 56 และ 63 หลังควั่นกิ่ง โดยทำการเก็บใบย่อยลิ้นจี่คู่ใบที่ 2 ของใบประกอบ และเก็บส่วนของเนื้อไม้และเปลือกกิ่งไม้ยาวประมาณ 3 ข้อนับจากปลายยอด จากนั้นทำการแช่ตัวอย่างพืชใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไนโตรเจนเหลวทันที จากนั้นนำไปทำให้แห้งโดยใช้ความเย็นด้วยเครื่อง Freeze dryer และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

5.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืช ซึ่งเป็นการศึกษาที่ประเทศสหพันสาธารณรัฐเยอรมันภายใต้ความร่วมมือของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และมหาวิทยาลัยโฮเฮนฮามย์ และการสนับสนุนงบประมาณโดย AG-BIO/PERDO-CHE โดยนำตัวอย่างพืชที่ผ่านการ Freeze dry แล้วจากประเทศไทย ไปดำเนินการตามวิธีดังต่อไปนี้

การสกัดตัวอย่างพืช (Plant sample extraction)

1) นำตัวอย่างพืชที่เก็บไว้ไปทำให้แห้งด้วยความเย็นภายใต้สภาพสุญญากาศ ด้วยเครื่อง Freeze dryer ชั่งน้ำหนักตัวอย่างพืช และบดตัวอย่างพืชให้ละเอียดด้วยโกร่งหรือเครื่องปั่น โดยเติมไนโตรเจนเหลวขณะบดตัวอย่าง เพื่อรักษาสภาพความเย็น

2) เติม cool methanol (เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส) ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

3) เก็บตัวอย่างใส่ขวดปิดฝาไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

4) กรองตัวอย่างที่สกัดแล้วผ่าน grassinter-filter ลงในขวดก้นกลม และนำสารละลายไประเหยแห้งด้วย Rotary evaporator (<40°C)

5) ล้างสารสกัดในขวดก้นกลมด้วย ammonium acetate 0.01 M 3 ครั้งๆ ละ 4 มิลลิลิตร โดยใช้ ultrasonic bath

6) เก็บสารละลาย ammonium acetate ที่ได้ทั้ง 12 มิลลิลิตร รวมกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

5.4.4 การทำให้สารละลายจากการสกัดตัวอย่างพืชบริสุทธิ์ (Purification)

การทำสารสกัดจากพืชให้บริสุทธิ์

1) การเตรียมคอลัมน์ คอลัมน์ประกอบด้วย 3 ส่วนคือ

ก) หลอดบรรจุสารละลาย (Reservoir) หลอดบรรจุ PVP (Polyvinylpyrrolidone)

ข) หลอดบรรจุ DEAE-sephadex (anion exchange)

ค) Sep-Pak-C_{18} โดยระหว่างหลอดจะมีวาล์วบังคับการไหลของสารละลาย

เริ่มต้นโดยเติม PVP 12 มิลลิลิตร ในหลอดที่ 2 และ DEAE-sephadex 6 มิลลิลิตร ในหลอดที่ 3 ทิ้งไว้ 30 นาที นำหลอดที่ 1, 2 และ3 มาต่อกัน (ยังไม่ใช้ Sep-Pak-C_{18} cartridge) จากนั้นเติม 0.1 M ammonium acetate pH 8.5 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 1 เปิดวาล์ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ให้สารละลายไหลผ่าน PVP ในหลอดที่ 2 และ DEAE- sephadex ในหลอดที่ 3 และปล่อยสารละลายทิ้งไปจนหมด ปิดวาล์ว (ระวังอย่าให้ PVP และ DEAE- sephadex แห้ง) จากนั้นเติม 0.01 M ammonium acetate pH 7.5 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 1 เปิดวาล์ว ให้สารละลายไหลผ่าน PVP ในหลอดที่ 2 และ DEAE- sephadex ในหลอดที่ 3 และปล่อยสารละลายทิ้งไปจนหมด ปิดวาล์ว (ระวังอย่าให้ PVP และ DEAE- sephadex แห้ง)

2) การปรับสภาพของ Sep-Pak-C_{18} cartridge ก่อนการใช้งาน

Cytokinins

ก) ผ่าน methanol (100%) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร 2 ครั้ง

ข) ผ่าน 0.01 M ammonium acetate pH 7.5 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร 2 ครั้ง

ABA, IAA และ GAs

ก) ผ่าน methanol (100%) ใน 0.1 M acetic acid ปริมาตร 4 มิลลิลิตร 2 ครั้ง

ข) ผ่าน 0.1 M acetic acid ปริมาตร 4 มิลลิลิตร 2 ครั้ง

3) การทำให้สารละลายจากการสกัดตัวอย่างพืชบริสุทธิ์

ก) นำสารสกัดตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้ที่ -20 °C มาละลายให้เป็นของเหลว จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทสารละลายส่วนใส (supernatant) ลงในขวดแก้วขนาด 30 มิลลิลิตร

ข) นำ cytokinins Sep-Pak-C_{18} ที่เตรียมไว้ ต่อเข้าที่ปลายคอลัมน์ นำสารสกัดตัวอย่างที่ได้จากข้อ (ก) เติมลงใน reservoir เปิดวาล์วให้สารสกัดตัวอย่างไหลลงผ่านคอลัมน์จนหมด ล้างขวดสารสกัดตัวอย่างด้วย 0.01 M ammonium acetate, pH 7.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วผ่านลงในคอลัมน์ ล้างขวดสารสกัดตัวอย่างด้วย 0.01 M ammonium acetate pH 7.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซ้ำอีก 3 ครั้ง แล้วผ่านลงในคอลัมน์ปล่อยสารละลายไหลผ่านจนหมด (ระวังไม่ให้สารละลายในระบบแห้ง) ในขั้นตอนนี้ ฮอร์โมนประเภทกรด IAA, GAs และ ABA จะถูกจับอยู่ที่ DEAE- sephadex ส่วน cytokinin จะถูกจับอยู่ใน Sep-Pak-C_{18}

ค) ถอด cytokinins Sep-Pak-C_{18} ออกจากคอลัมน์ ปิดปลายคอลัมน์ด้วย septum ถอดเอาหลอดที่ 2 (PVP) ออกไป จัดคอลัมน์ใหม่เหลือเฉพาะหลอดที่ 1 (reservoir) และหลอดที่ 3 (DEAE- sephadex) ต่อกัน นำ ABA /GAs Sep-Pak-C_{18} ที่เตรียมไว้ (เป็นอันเดียวกัน) ต่อเข้าที่ปลายคอลัมน์ ชะ ABA /GAs จาก DEAE- sephadex ลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สู่ Sep-Pak-C_{18} โดย 0.75 M acetic acid 15 มิลลิลิตร จากนั้นถอด ABA / GAs Sep-Pak-C_{18} ออก ปิดปลายคอลัมน์ด้วย septum นำ IAA sep-pak ที่เตรียมไว้ ต่อเข้าที่ปลายคอลัมน์ ชะ IAA จาก DEAE- sephadex ลงสู่ sep-pak โดย 2 M acetic acid 15 มิลลิลิตร

ง) การชะฮอร์โมนออกจาก Sep-Pak-C_{18} แต่ละชนิดโดยใช้สารละลายเมทานอลใน 0.1 M acetic acid ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน ดังนี้

IAA	40% methanol in 0.1 M acetic acid
ABA	50% methanol in 0.1 M acetic acid
GAs	65% methanol in 0.1 M acetic acid
Z/ZR	30% methanol in 0.1 M acetic acid
i-Ado/i-Ade	80% methanol in 0.1 M acetic acid

เมื่อเสร็จสิ้นขบวนการจะได้สารละลายฮอร์โมนชนิดต่างๆ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และนำไปทำให้แห้งด้วย Speed Vacuum concentrator ข้ามคืน เพื่อรอการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนต่อไป

5.4.5 การทำให้ leaf diffusates บริสุทธิ์ (ดัดแปลงจาก Posthumus, 1973; Sweetser and Swartzfager, 1978)

สำหรับการวิเคราะห์ฮอร์โมน IAA

ก) นำสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาละลายให้เป็นของเหลว

ข) ละลายสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์มาปรับ pH เท่ากับ 3.0 ด้วย acetic acid ความเข้มข้น 4 M

ค) ชะสารละลายตัวอย่างผ่าน Sep-Pak-C_{18} จากนั้นล้าง Sep-Pak-C_{18} ด้วย acetic acid ความเข้มข้น 4 M ปริมาตร 4 มิลลิลิตร จำนวน 1 ครั้ง

ง) ชะ IAA ด้วย 40% methanol in 0.1 M acetic acid ปริมาตร 4 มิลลิลิตร จากนั้นดูด aliquot ใส่ในvial tube หลอดละ 1.3 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอด

จ) นำไปทำให้แห้งด้วย Speed Vacuum concentrator ข้ามคืนเพื่อรอการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สำหรับการวิเคราะห์ฮอร์โมน Cytokinin

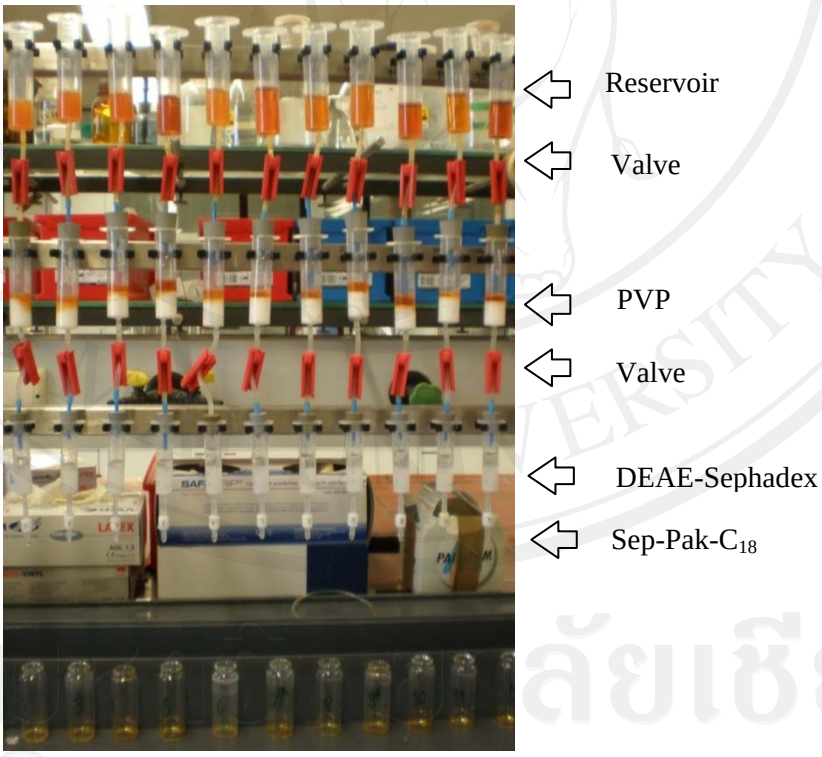
ก) นำสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร มาละลายให้เป็นของเหลว

ข) ละลายสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์มาปรับ pH เท่ากับ 3.0 ด้วย acetic acid ความเข้มข้น 4 M

ค) ชะสารละลายตัวอย่างผ่าน Sep-Pak-C_{18} จากนั้นล้าง Sep-Pak-C_{18} ด้วย acetic acid ความเข้มข้น 4 M ปริมาตร 4 มิลลิลิตร จำนวน 1 ครั้ง

ง) ชะ Z/ZR ด้วย 30% methanol in 0.1 M acetic acid ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และ i-Ado/i-Ade ด้วย 80% methanol in 0.1 M acetic acid จากนั้นดูด aliquot ใส่ใน vial tube หลอดละ 1.3 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอด

จ) นำไปทำให้แห้งด้วย Speed Vacuum concentrator ข้ามคืนเพื่อรอการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนต่อไป



ภาพที่ 10 ส่วนประกอบของคอลัมน์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.4.6 การตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนพืชด้วยเทคนิค RIA (Radioimmunoassay)

1) สารเคมีที่ต้องเตรียม

ก) Phosphate buffer 250 µl/tube ชั่ง KH_2PO_4 0.46 กรัม K_2HPO_4 1.36 กรัม NaCl 10.4 กรัม ละลายในน้ำ 1.2 ลิตร จากนั้นปรับ pH เท่ากับ 7.4

ข) Calf serum 50 µl/tube ใช้สำหรับตกตะกอนโปรตีนหรือตกตะกอนแอนติบอดีในระหว่างการทำปฏิกิริยา โดยเจือจางซีรั่ม 1: 10 (450 ml of fresh buffer + 50 ml serum)

ค) ^{3}H-Hormone (tracer) 50 µl/tube (1.5 MBq.; 25000 dpm)

ง) Antibody: 50 µl/tube

จ) Saturated Ammonium sulphate:750 µl/tubeชั่ง Ammonium sulphate 790 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปั่นด้วย magnetic stirrer จนกระทั่ง Ammonium sulphate อิ่มตัว (ยังคงมีตะกอนเหลืออยู่)

2) ตัวอย่างที่ต้องการตรวจวัด

ก) สารละลายตัวอย่างที่ได้จากการระเหยแห้งด้วยเครื่อง Speed Vacuum concentrator

ข) สำหรับฮอร์โมนประเภทกรด (IAA, GAs, ABA) ต้องผ่านการ methylation โดยเติม ethereal diazometane 50 µl ปิดฝาหลอด บ่มในที่มืด 30 นาที จากนั้นเปิดฝาให้ ethereal diazometane ระเหยแห้ง (ต้องทำในตู้ดูดควันเท่านั้น)

3) Dispensing

	Bo (maximum bound activity)	NSB (non specific binding)	Bx (bound activity in presence of sample)	To (total radioactivity added)
Buffer	+	+	+	-
Calf serum	+	+	+	-
H-Hormone	+	+	+	+
Antibody	+	-	+	-

$$\% \; \boldsymbol{bound\ radioactivity} = \frac{\boldsymbol{100 \times (Bx - NSB)}}{\boldsymbol{(Bo - NSB)}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4) ขั้นตอนการตรวจวัด

ก) เติม phosphate buffer ลงในหลอดแก้วทั้งหมดที่วางเรียงใน rack และเขย่าที่ 1200 rpm

ข) เติม serum, ^{3}H-Hormone และ antibody เขย่าที่ 1200 rpm บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ในระหว่างบ่ม เขย่าที่ 1200 rpm อีก 1 ครั้ง (หลังจากครั้งแรก 15 นาที)

ค) เติม ammonium sulphate 90% ปริมาตร 750 µl เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้โปรตีนตกตะกอน

ง) นำหลอดแก้วไปหมุนเหวี่ยงที่ 4000 rpm เป็นเวลา 40 นาที

จ) เทส่วน supernatant ทิ้งลงในภาชนะจัดเก็บสารกัมมันตรังสี ซับปากหลอดแก้วโดยคว่ำ rack ลงบนกระดาษชำระ

ฉ) เติม ammonium sulphate 50% ปริมาตร 750 µl นำหลอดแก้วไปหมุนเหวี่ยงที่ 4000 rpm เป็นเวลา 30 นาที

ช) เทส่วน supernatant ทิ้งลงในภาชนะจัดเก็บสารกัมมันตรังสี ซับปากหลอดแก้วโดยคว่ำ rack ลงบนกระดาษชำระ

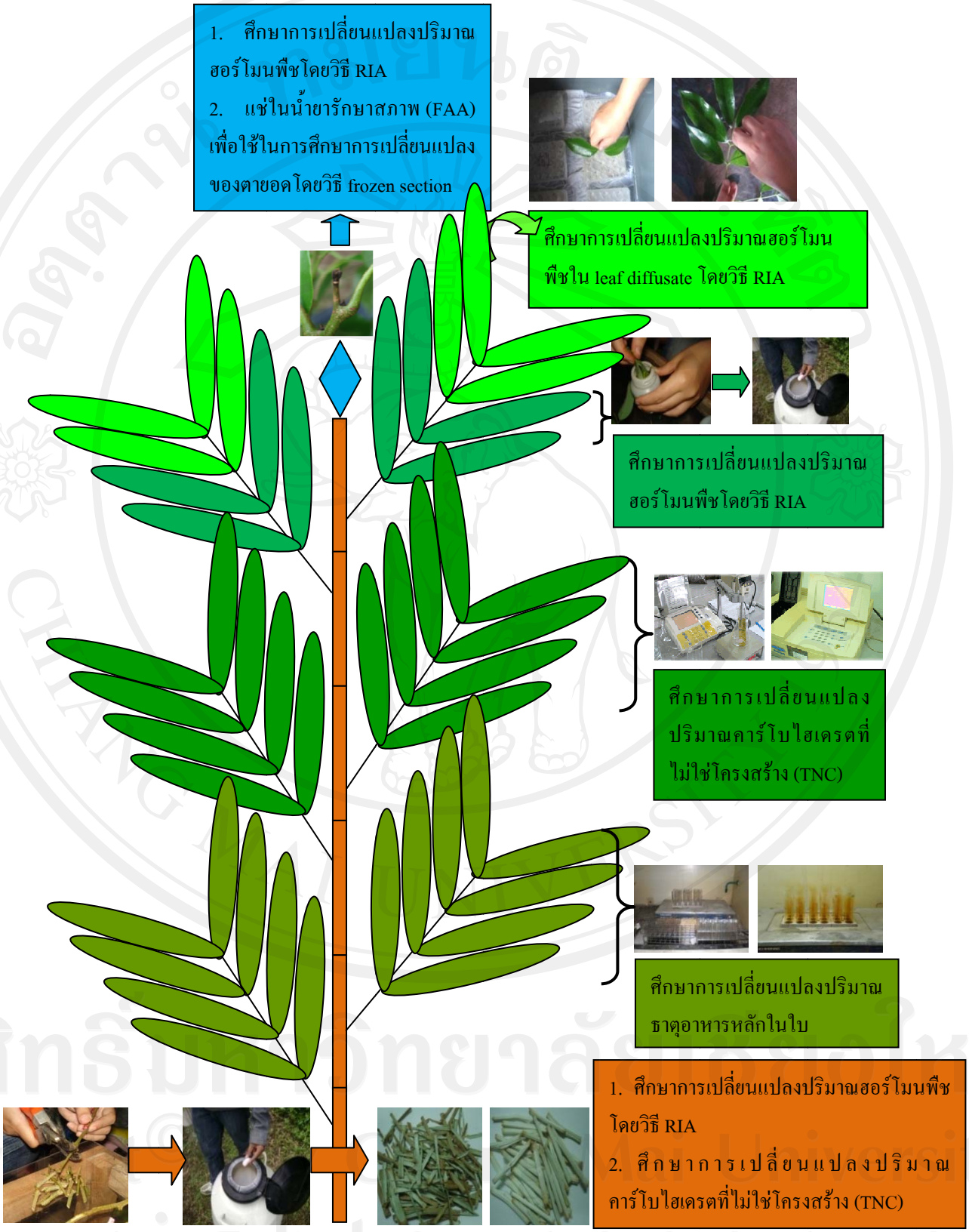
ซ) เติมน้ำกลั่น 200 µl แล้วเขย่า

ฌ) เติม scintillator ปิดฝาหลอดแก้วให้แน่น ด้วย plastic stoppers

ญ) เขย่าให้สารละลายผสมกัน จากนั้นนำไปวัดค่ากัมมันตรังสี และคำนวณค่าจากกราฟมาตรฐานของฮอร์โมนแต่ละชนิด

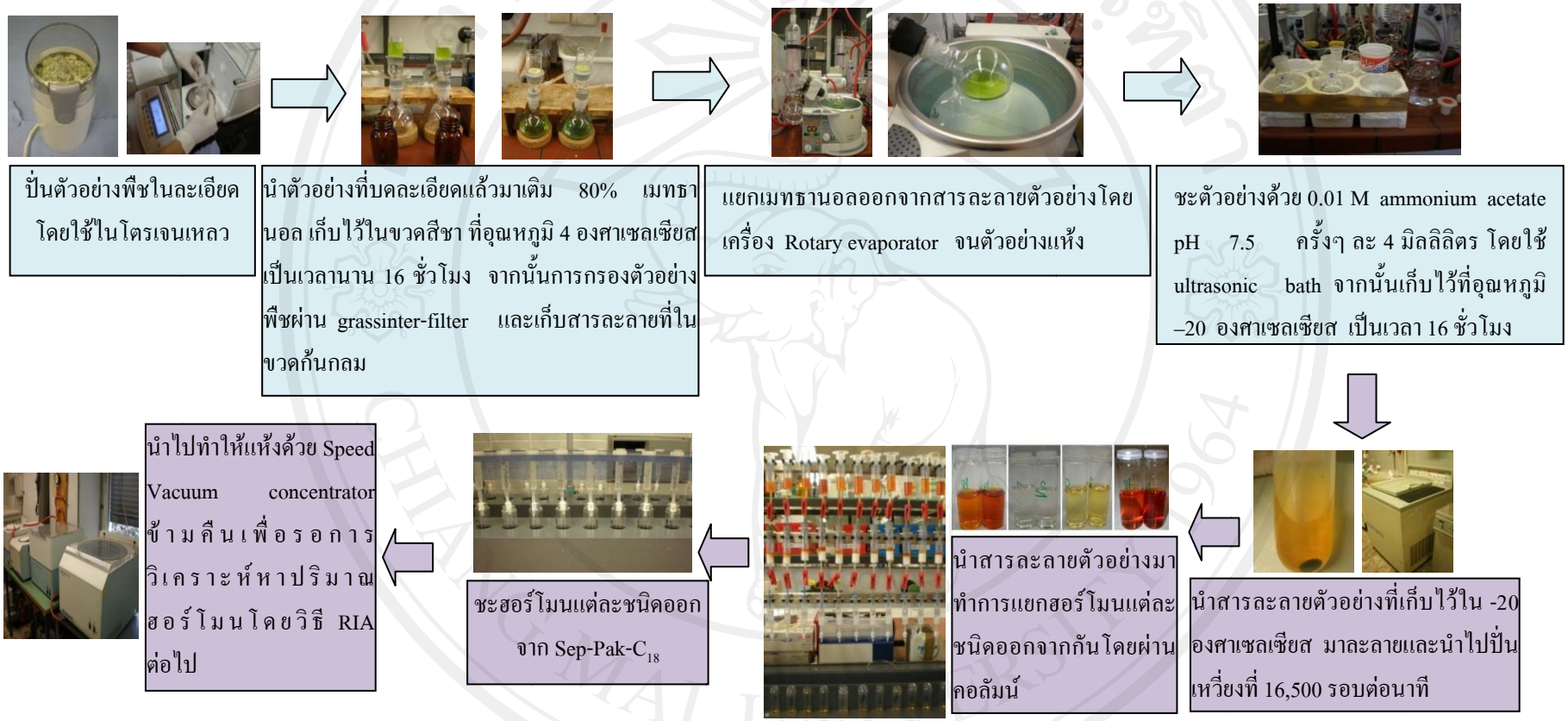
6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SPSS for windows

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 11 การเก็บตัวอย่างพืชเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 12 ขั้นตอนการสกัดตัวอย่างพืชเพื่อวิเคราะห์ฮอร์โมนพืช

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved