บทที่3
อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 อิทธิพลของพันธุ์ข้าวที่มีต่อการทำกราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินโดยวิธี Rice Secondary Leaf Sheath Bioassay (RSLSB) (ตามวิธีการของ นพพร, 2539)

วางแผนการทดลองแบบ 3x4 ปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ ทำ 12 ซ้ำ ปัจจัยที่ 1 คือพันธุ์ข้าว 3 พันธุ์ คือ แพร่ 1, สุพรรณบุรี 2, กข 7 ปัจจัยที่ 2 คือความเข้มข้นของจิบเบอเรลลิน (GA_3 (Kyowa)) 4 ระดับคือ $1x10^{-7}$, $1x10^{-5}$, $1x10^{-3}$, $1x10^{-1}$ สตล โดยมีหนึ่งหน่วยการทดลองคือต้นกล้าข้าว 10 ต้น (นพพร,2539)

วิธีการ

1. นำเมล็ดข้าวพันธุ์ละประมาณ 600 เมล็ด มาฆ่าเชื้อโดยแช่ในสารละลาย sodium hypochlorite 5.25% : น้ำ (1:10 โดยปริมาตร) เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

2. เพาะเมล็ดข้าวแต่ละพันธุ์บนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ที่วางอยู่ในกล่องพลาสติกขนาด 16x24x8 เซนติเมตร (กว้างxยาวxสูง) จำนวน 4 กล่อง พ่นน้ำกลั่นให้เปียกชุ่มปิดฝากล่องแล้วนำไปไว้ในที่มืดในตู้ควบคุมสภาพแวดล้อม (growth chamber) ที่มีอุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน

3. เตรียมสารละลาย GA_3 (Kyowa) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ความเข้มข้นละ 500 มิลลิลิตร โดยเตรียมจากการทำ stock สารละลาย GA_3 (Kyowa) ความเข้มข้น 2,000 สตล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ดังนี้ (GA_3(Kyowa) 2,000 สตลในน้ำ 50 มิลลิลิตรมีเนื้อสาร 100 มิลลิกรัม)

GA_3(Kyowa) 1.6 กรัม มีเนื้อสารอยู่ 50 มิลลิกรัม

ถ้าต้องการเนื้อสาร 100 มิลลิกรัม จะต้องชั่งสาร $\frac{100x1.6}{50}$ = 3.2 กรัม

ดังนั้นชั่ง GA_3(Kyowa) มา 3.2000 กรัม ด้วยเครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นใน volumetric flask ให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย GA_3(Kyowa) ความเข้มข้น 2,000 สตล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำ stock solution ที่ได้ไปเจือจางให้เป็น 1 สตล ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ดังนี้

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

$$V_1 = \frac{1,000 \times 1}{2,000} = 0.5 \text{ มิลลิลิตร}$$

N_1= ความเข้มข้นของ stock GA_3 (Kyowa) หน่วยเป็น สตล

N_2= ความเข้มข้นของ GA_3(Kyowa) ที่ต้องการ หน่วยเป็น สตล

V_1= ปริมาตรของ stock GA_3(Kyowa) หน่วยเป็นมิลลิลิตร

V_2= ปริมาตรของ GA_3(Kyowa) ความเข้มข้นที่ต้องการ หน่วยเป็นมิลลิลิตร

ดังนั้นจึงใช้ graduate pipet ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ดูดสารละลายมา 0.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ใน volumetric flask จะได้สารละลาย GA_3 (Kyowa) ความเข้มข้น 1 สตล ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ส่วนการเตรียม GA_3 (Kyowa) ความเข้มข้น $1x10^{-1}$, $1x10^{-3}$, $1x10^{-5}$, $1x10^{-7}$ สตล สามารถเตรียมได้จาก GA_3(Kyowa) ความเข้มข้น 1 สตล โดยคำนวณจากสูตรและเตรียมโดยวิธีการเดียวกัน

4. ตัดกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ใส่ลงในกล่องพลาสติกขนาด 6x4x3.5 เซนติเมตร แล้วใช้ graduate pipet ดูดสารละลาย GA_3(Kyowa) ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ในข้อ 3 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในกล่องพลาสติกความเข้มข้นละ 12 กล่อง

5. คัดเมล็ดข้าวที่มี coleoptile ยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร จากข้อ 2 ใส่ในกล่องพลาสติกในข้อ 4 กล่องละ 10 ต้น ปิดฝากล่องแล้วปิดด้วยเทปกาว แล้วนำไปไว้ในตู้ควบคุมสภาพแวดล้อมซึ่งมีแสงจากหลอด fluorescent ความเข้มแสงประมาณ 3,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

การบันทึกผลการทดลอง

1. วัดความยาวของ secondary leaf sheath เมื่ออายุได้ 7 วัน หลังจากบ่ม

2. วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยโปรแกรม Statistix 3.5 ของ NH analytical software โดยวิเคราะห์ test of AOV Assumption, AOV, C.V., Polynomial contrast, LSD, Linear regression และ Correlation

การทดลองที่ 2 อิทธิพลของเวลาที่แตกต่างกันในการทำกราฟมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์สารคล้ายจิบเบอเรลลินโดยวิธี RSLSB

วางแผนการทดลองแบบ 2x4 ปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ ทำ 8 ซ้ำ ปัจจัยที่ 1 คือ ช่วงเวลาที่ทำการทดลอง 2 ช่วงคือ 29 กรกฎาคม ถึง 5 สิงหาคม พ.ศ. 2541 และ 19 สิงหาคม ถึง 26 สิงหาคม พ.ศ. 2541 ปัจจัยที่ 2 คือความเข้มข้นของจิบเบอเรลลิน (GA_3(Kyowa)) 4 ระดับคือ $1x10^{-7}$, $1x10^{-5}$, $1x10^{-3}$, $1x10^{-1}$ สตอ โดยหนึ่งหน่วยการทดลองคือต้นกล้าข้าว 10 ต้น (นพพร,2539) ใช้ข้าวพันธุ์แพร่ 1 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่คัดเลือกจากการทดลองที่ 1

วิธีการ

ทำ RSLSB เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 1-5

การบันทึกผลการทดลอง

1.วัดความยาวของ secondary leaf sheath เมื่ออายุได้ 7 วันหลังจากบ่ม

2.วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยโปรแกรม Statistix 3.5 ของ NH analytical software โดยวิเคราะห์ test of AOV Assumption, AOV, C.V. และ LSD

การทดลองที่ 3 การหาตำแหน่ง R_f ที่มี activity ของสารคล้ายจิบเบอเรลลินในยอดมะปราง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์มี 11 วิธีการ ใช้ R_f 0.1-1.0 และ control เป็นวิธีการ ทำ 5 ซ้ำ โดยหนึ่งหน่วยการทดลองคือต้นกล้าข้าว 10 ต้น(นพพร,2539)

วิธีการ การเก็บตัวอย่าง การสกัด การแยกส่วน การทำให้บริสุทธิ์ การทำ RSLSB ใช้วิธีการตามแบบของนพพร(2539)

1. การเก็บตัวอย่าง ตัดยอดมะปรางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง(วัดที่โคนกิ่ง) 0.3-0.4 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร จำนวน 30 ยอดต่อหนึ่งหน่วยการทดลอง ตัดใบทิ้งแล้วใส่ถุงพลาสติกแช่น้ำแข็งในกระติกน้ำแข็งแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ –30 องศาเซลเซียส เพื่อสกัดต่อไป

2. การสกัด นำตัวอย่างแต่ละถุงมาปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นมูลิเน็กซ์ ชั่งน้ำหนักตัวอย่างสดให้ได้ 20.0000 กรัมด้วยเครื่องชั่งละเอียด แล้วนำมาใส่ใน erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม methanol 95%(lab grade) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายให้ผสมกันแล้วนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์1 แล้วนำกากไปสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง นำสารละลายที่กรองได้มารวมกันแล้วนำไประเหยด้วยเครื่องระเหยความดันต่ำ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสจนแห้งติดก้นขวด แล้วจึงละลายส่วนที่แห้งด้วย 0.5 M sodium phosphate buffer pH 8.0 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร

3. การแยกส่วน นำสารละลายในข้อ 2 มาแยกส่วนด้วยกรวยแยก (separatory funnel) โดยใช้ ethyl acetate 100% (AR grade) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้จนสารละลายแยกชั้น แยกเอาส่วนบน (ethyl acetate) เก็บไว้ นำชั้นล่างซึ่งเป็นสารละลายบัฟเฟอร์มาปรับ pH ให้เป็น 2.0-2.5 ด้วย HCl เข้มข้น 6 N แล้วนำไปแยกส่วนด้วย ethyl acetate ปริมาตร 20 มิลลิลิตร อีก 4 ครั้ง จากนั้นนำสารละลาย ethyl acetate ที่ได้ทั้ง 5 ครั้ง มารวมกันแล้วนำไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยความดันต่ำที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จนแห้งติดก้นขวด แล้วละลายส่วนที่แห้งด้วย methanol 95% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric pipet แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

4. การทำให้บริสุทธิ์

4.1 ใช้วิธีเปเปอร์โครมาโตกราฟฟี เริ่มจากเตรียมแผ่น chromatogram โดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาด 9x28 เซนติเมตร ขีดเส้นกำหนดจุดเริ่มต้นที่จะ strip สารโดยขีดด้วยดินสอดำห่างจากขอบล่าง 2 เซนติเมตร และจุดสุดท้ายที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปถึง (16.5 เซนติเมตร วัดจากจุดที่จะ strip สาร) นำสารละลายจากข้อ 3 มา strip ลงบนแผ่น chromatogram โดยใช้ตัวอย่างแผ่นละ 100 µl (ซึ่งเทียบเท่าตัวอย่างสด 2 กรัม)

4.2 หลังจากทิ้งให้แถบสารแห้งแล้วจึงนำแผ่น chromatogram ไปแช่ใน chamber ที่มีตัวทำละลาย isopropanol 99.7%(AR grade) : NH_4OH 25%(AR grade) : น้ำกลั่น (10:1:1 โดยปริมาตร) โดยให้แถบสารอยู่เหนือตัวทำละลาย ทิ้งไว้จนตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปจนถึงระยะ 16.5 เซนติเมตร วัดจากรอย strip สาร ใช้เวลาประมาณ 6-7 ชั่วโมง แล้วนำไปผึ่งให้แห้ง

4.3 หลังจากแห้งแล้วแบ่งแผ่นโครมาโตแกรมเป็น R_f 0.1-1.0 โดยส่วนที่อยู่ใต้แถบสารเป็น control (R_f 0.0) ส่วน R_f 0.1-1.0 คือส่วนที่อยู่เหนือแถบสารจนถึง solvent front ให้แบ่งเป็น 10 ส่วนเท่า ๆ กัน ตัดกระดาษแต่ละ R_f ใส่ในกล่องพลาสติกขนาด 6x4x3.5 เซนติเมตร ซึ่งมีสารละลาย 0.01 M potassium phosphate buffer pH 5.0 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

5. การทำ Rice Secondary Leaf Sheath Bioassay

5.1 นำเมล็ดข้าวพันธุ์แพร่ 1 แช่ในสารละลาย sodium hypochlorite (5.25%):น้ำ (1:10 โดยปริมาตร) เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วนำไปเพาะในที่มืดที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

5.2 การบ่ม คัดเมล็ดข้าวที่มี coleoptile ยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร วางลงในกล่องพลาสติกในข้อ 4.3 กล่องละ 10 ต้น ปิดฝากล่องแล้วปิดด้วยเทปกาว นำไปไว้ในตู้ควบคุมสภาพแวดล้อมที่มีแสงจากหลอด fluorescent ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

การบันทึกผลการทดลอง

1. วัดความยาวของ secondary leaf sheath เมื่ออายุได้ 7 วันหลังจากบ่ม

2. เทียบหาปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินจากกราฟมาตรฐานมีหน่วยเป็น mg GA_3(Kyowa) equivalent / g f. wt. วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยโปรแกรม Statistix 3.5 ของ NH analytical software โดยวิเคราะห์ test of AOV Assumption, AOV, C.V. และ LSD

การทดลองที่ 4 การหาตำแหน่ง R_f ที่มี activity ของสารคล้ายจิบเบอเรลลินในยอดลิ้นจี่

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์มี 11 วิธีการ ใช้ R_f 0.1-1.0 และ control เป็นวิธีการ ทำ 7 ซ้ำ โดยหนึ่งหน่วยการทดลองคือต้นกล้าข้าว 10 ต้น (นพพร,2539)

วิธีการ

การเก็บตัวอย่างยอดลิ้นจี่ การสกัด การแยกส่วน การทำให้บริสุทธิ์ การทำ RSLSB ทำเหมือนการทดลองที่ 3

การบันทึกผลการทดลอง

1. วัดความยาวของ secondary leaf sheath เมื่ออายุได้ 7 วันหลังจากบ่ม

2. เทียบหาปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินจากกราฟมาตรฐานมีหน่วยเป็น mg GA_3(Kyowa) equivalent / g f. wt. วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยโปรแกรม Statistix 3.5 ของ NH analytical software โดยวิเคราะห์ test of AOV Assumption, AOV, C.V. และ LSD

การทดลองที่ 5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินในช่วงก่อนการแตกใบอ่อนของยอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้า

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำ 9 ซ้ำ โดยใช้จำนวนสัปดาห์ก่อนการแตกใบอ่อน 5 สัปดาห์คือ 0, 1, 2, 3, 4 สัปดาห์เป็นวิธีการ โดยหนึ่งหน่วยการทดลองคือต้นกล้าข้าว 10 ต้น (นพพร,2539)

วิธีการ การเก็บตัวอย่าง การสกัด การแยกส่วน การทำให้บริสุทธิ์ การทำ RSLSB ใช้วิธีการตามแบบของนพพร(2539)

1. การเก็บตัวอย่าง เริ่มเก็บตัวอย่างวันที่ 19 กรกฎาคม พ.ศ. 2540 และเก็บทุก ๆ 7 วัน เก็บตัวอย่างวันสุดท้ายวันที่ 16 สิงหาคม พ.ศ. 2540 โดยตัดยอดมะปรางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง(วัดที่โคนกิ่ง) 0.3-0.4 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร (30 ยอดต่อหนึ่งหน่วยการทดลอง) ตัดใบทิ้งแล้วใส่ถุงพลาสติกแช่น้ำแข็งในกระติกน้ำแข็ง แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ –30 องศาเซลเซียส เพื่อสกัดต่อไป

2. การสกัด การแยกส่วน และการทำให้บริสุทธิ์ ทำเหมือนการทดลองที่ 3 แต่การ strip สารลงบนแผ่น chromatogram จะ strip สารแผ่นละ 40 µl (ซึ่งเทียบเท่ากับตัวอย่างสด 0.8 กรัม)

3. การหาปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลิน

3.1 ตัดแผ่นโครมาโตแกรมเฉพาะ R_f 0.3-0.8 ซึ่งเป็น R_f ที่พบ activity ของสารคล้ายจิบเบอเรลลิน (ผลการทดลองที่ 3) ใส่ในกล่องพลาสติกขนาด 6x4x3.5 เซนติเมตร ที่มีสารละลาย 0.01 M potassium phosphate buffer pH 5.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.2 หาปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลิน ใช้วิธี RSLSB โดยนำเมล็ดข้าวพันธุ์แพร่ 1 ที่มี coleoptile ยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร วางลงในกล่องพลาสติกในข้อ 3.1 กล่องละ 10 ต้น ปิดฝากล่องแล้วปิดด้วยเทปกาว นำไปไว้ในตู้ควบคุมสภาพแวดล้อมที่มีแสงจากหลอด fluorescent ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

การบันทึกผลการทดลอง

1. วัดความยาวของ secondary leaf sheath เมื่ออายุได้ 7 วัน หลังจากบ่ม

2. เทียบหาปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินจากกราฟมาตรฐานมีหน่วยเป็น mgGA_3 (Kyowa) equivalent/g f. wt. วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยโปรแกรม Statistix 3.5 ของ NH analytical software โดยวิเคราะห์ test of AOV Assumption, AOV, C.V., LSD, Linear regression และ Correlation

การทดลองที่ 6 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินในช่วงก่อนการแตกใบอ่อนของยอดลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำ 9 ซ้ำ โดยใช้จำนวนสัปดาห์ก่อนการแตกใบอ่อน 5 สัปดาห์คือ 0, 1, 2, 3, 4 สัปดาห์เป็นวิธีการ โดยหนึ่งหน่วยการทดลองคือต้นกล้าข้าว 10 ต้น (นพพร,2539)

วิธีการ การเก็บตัวอย่าง การสกัด การแยกส่วน การทำให้บริสุทธิ์ การทำ RSLSB ใช้วิธีการตามแบบของนพพร(2539)

1. การเก็บตัวอย่าง เริ่มเก็บตัวอย่างวันที่ 17 ตุลาคม พ.ศ. 2540 และเก็บทุก ๆ 7 วัน เก็บตัวอย่างวันสุดท้ายวันที่ 16 มกราคม พ.ศ. 2541 โดยตัดยอดลิ้นจี่ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง(วัดที่โคนกิ่ง) 0.3-0.4 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร (30 ยอดต่อหนึ่งหน่วยการทดลอง) ตัดใบทิ้งแล้วใส่ถุงพลาสติกแช่น้ำแข็งในกระติกน้ำแข็ง แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส เพื่อสกัดต่อไป

2. การสกัด การแยกส่วน และการทำให้บริสุทธิ์ ทำเหมือนการทดลองที่ 5

3. การหาปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลิน

3.1 ตัดแผ่นโครมาโตแกรมเฉพาะ R_f 0.3-0.8 ซึ่งเป็น R_f ที่พบ activity ของสารคล้ายจิบเบอเรลลิน(ผลการทดลองที่ 4)ใส่ในกล่องพลาสติกขนาด 6x4x3.5 เซนติเมตร ที่มีสารละลาย 0.01 M potassium phosphate buffer pH 5.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.2 หาปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลิน ใช้วิธี RSLSB โดยนำเมล็ดข้าวพันธุ์แพร่ 1 ที่มี coleoptile ยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร วางลงในกล่องพลาสติกในข้อ 3.1 กล่องละ 10 ต้น ปิดฝากล่องแล้วปิดด้วยเทปกาว นำไปไว้ในตู้ควบคุมสภาพแวดล้อมที่มีแสงจากหลอด fluorescent ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

การบันทึกผลการทดลอง

1. วัดความยาวของ secondary leaf sheath เมื่ออายุได้ 7 วัน หลังจากบ่ม

2. เทียบหาปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินจากกราฟมาตรฐานมีหน่วยเป็น $mgGA_3$ (Kyowa) equivalent/g f. wt. วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยโปรแกรม Statistix 3.5 ของ NH analytical software โดยวิเคราะห์ test of AOV Assumption, AOV, C.V., LSD, Linear regression และ Correlation

เวลาดำเนินการทดลอง

กรกฎาคม พ.ศ. 2540 – ตุลาคม พ.ศ. 2541

สถานที่ดำเนินการทดลอง

สวนวังน้ำค้าง อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่

สวนสองแสน ดอยปุย อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University