# บทที่ 3

## อุปกรณ์และวิธีการ

### การทดลองที่ 1 ผลของระดับไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของดองดึง

1.1 วัสดุและอุปกรณ์ในการทดลอง

1.1.1 พืชทดลองและอุปกรณ์ในการปลูกดองดึง

1.1.1.1 หัวพันธุ์ดองดึงยาว 7-11 เซนติเมตร

1.1.1.2 ถังน้ำขนาด 20 ลิตร จำนวน 20 ถัง

1.1.1.3 เชือกไนลอนสำหรับทำตาข่าย

1.1.1.4 ตะกร้าพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 29.5 เซนติเมตร ลึก 10.5 เซนติเมตร

1.1.1.5 น้ำ deionize

1.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน กรดอะมิโน โปรตีน และโคลชิซีน

1.1.2.1 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ของบริษัท HITACHI รุ่น U-2001

1.1.2.2 เตาย่อยตัวอย่างพืชของบริษัท TECHNE รุ่น DB-4

1.1.2.3 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge)

1.1.2.4 เครื่องอัลตราโซนิก บาธ ( ultrasonic bath) รุ่น 3510E-MTH ของบริษัท BRANSONIC®

1.1.2.5 เครื่องบดตัวอย่างพืชรุ่น MF 10 ของบริษัท BECTHAI

1.1.2.6 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

1.1.2.7 เตาอุ่นความร้อนและเครื่องคน (hot plate and magnetic stirrer)

1.1.2.8 เครื่องปั่น (vortex)

1.1.2.9 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

1.1.2.10 ตู้อบ

1.1.2.11 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

1.1.2.12 เครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลองทางเคมี เช่น บีกเกอร์ ปิเปต ขวดปรับปริมาตร แท่งแก้วคน กรวย กระบอกตวง หลอดทดลอง ขวดสีชา ขวดแก้วรูปชมพู่

1.1.2.13 อุปกรณ์อื่นๆ เช่น นาฬิกาจับเวลา ช้อนตักสาร พาราฟิลม์ โกร่ง หลอดเซนตริฟิวจ์ กระดาษ foil กระดาษกรองเบอร์ 1 ของ Whatmann$^{R}$

1.1.2.14 ขวดพลาสติกสำหรับใส่สารละลาย

1.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

1.1.3.1 กล้องจุลทรรศน์สองตาแบบสเตอริโอ

1.1.3.2 กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

1.1.3.3 เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุน (rotary microtome) พร้อมมีด

1.1.3.4 ตู้อบที่ปรับอุณหภูมิให้เป็น 56 องศาเซลเซียส

1.1.3.5 แผ่นให้ความร้อน (hot plate)

1.1.3.6 กระจกสไลด์และกระจกปิดสไลด์

1.1.3.7 อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บีกเกอร์ กระบอกตวง จานแก้ว ขวดแก้วใส่น้ำยา ขวดแก้วย้อมสี และขวดสำหรับใส่ชิ้นส่วนพืช

1.1.3.8 เครื่องใช้อื่นๆ ได้แก่ ตะเกียงแอลกอฮอล์ ไม้ขีดไฟ พู่กัน ปากคีบ หลอดหยด สลากติดชื่อ และกระดาษกาว

1.1.3.9 แท่งไม้ขนาด 1.5 x 1.5 x 1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร (ลบ.ซม.) ที่ต้มให้อิ่มตัวในพาราฟิน

1.2 สารเคมีในการทดลอง

1.2.1 สารเคมีในการเตรียมสารละลาย โดยใช้ปริมาณเกือบจางตามสูตรของ Hoagland and Arnon ในปี 1950 (Jones, 1997) ดังแสดงในตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** องค์ประกอบของสารละลายธาตุอาหาร

| สารละลายเข้มข้น | ปริมาณเจือจาง (มิลลิลิตร /ลิตร) |
|---|---|
| ธาตุอาหารหลัก | |
| 1.0 โมลาร์ แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NH_4H_2PO_4$) | 1.0 |
| 1.0 โมลาร์ โพแทสเซียมไนเตรท ($KNO_3$) | 6.0 |
| 1.0 โมลาร์ แคลเซียมไนเตรท [$Ca(NO_3)_2.4H_2O$] | 4.0 |
| 1.0 โมลาร์ แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) | 2.0 |
| 0.5 โมลาร์ แคลเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต [$Ca(H_2PO_4)_2.2H_2O$] | 1.0 |
| 0.5 โมลาร์ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ [$Ca(OH)_2$] | 7.0 |
| 1.0 โมลาร์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) | 6.0 |
| 1.0 โมลาร์ แอมโมเนียมไนเตรท ($NH_4NO_3$) | 7.5 |
| ธาตุอาหารรอง | |
| 0.05 โมลาร์ บอริค แอซิด ($H_3BO_3$) | 2.0 |
| 0.009 โมลาร์ แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$) | 2.0 |
| 0.0008 โมลาร์ ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.5H_2O$) | 2.0 |
| 0.0003 โมลาร์ คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) | 2.0 |
| 0.0001 โมลาร์ โมลิปเดต แอซิด ($H_2MoO_4.H_2O$) | 2.0 |
| 0.5 เปอร์เซ็นต์ เหล็กคีเลต (FeEDTA) | 6.0 |

1.2.2 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ไนโตรเจน กรดอะมิโน โปรตีน และโคลชิซีน

1.2.2.1 สารเคมีสำหรับการวิเคราห์ไนโตรเจน ได้แก่ EDTA.2Na, $KH_2PO_4$, $Na_2HPO_4.7H_2O$, $Na_3PO_4.12H_2O$, เอทธานอล เมทธิลเรด โซเดียมไฮดรอไซด์ กรดเบนโซอิค โซเดียมไนโตรพรัสไซด์ ฟีนอล โซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ กรดซัลฟูริค

1.2.2.2 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์กรดอะมิโน ได้แก่ นินไฮดริน เมททอกซีเอทธานอล (เอทธิลีนไกลคอล) กรดแอสคอร์บิค กรดซิตริค โซเดียมไฮดดรอกไซด์ เอทธานอล แอสพาราจีน และ กลูตามีน

1.2.2.3 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์โปรตีน ได้แก่ Folin - Ciocalteau reagent คอปเปอร์ซัลเฟต โซเดียมโพแทสเซียมตาร์เตรท โซเดียมไฮดรอกไซด์ โซเดียมคาร์บอเนต และ แอลบูมิน โบไวน์

1.2.2.4 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์โคลชิซิน โดยวิธีของ (Kitcharoen and Eknamkul, 1993)

1.2.3 สารเคมีในการเตรียมเนื้อเยื่อพืชที่ใช้ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา (Johansen, 1940)

1.2.3.1 น้ำยาตรึงและรักษาเซลล์ (killing and fixing solution) ได้แก่ FAA (formalin - acetic acid - alcohol) ประกอบด้วย

| | |
|---|---|
| เอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ | 50 มิลลิลิตร |
| กรดอะซิติค | 50 มิลลิลิตร |
| ฟอร์มาลิน | 10 มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่น | 35 มิลลิลิตร |

1.2.3.2 น้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution) ประกอบด้วยเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เอทธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ tertiary butyl alcohol (TBA) และน้ำกลั่น โดยใช้ส่วนผสมในอัตราที่แตกต่างกัน 5 ระดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

**ตารางที่ 2** อัตราส่วนของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์

| ระดับของน้ำยา (เปอร์เซ็นต์) | เอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (มิลลิลิตร) | เอทธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ (มิลลิลิตร) | TBA (มิลลิลิตร) | น้ำกลั่น (มิลลิลิตร) |
|---|---|---|---|---|
| 50 | 40 | - | 10 | 50 |
| 70 | 50 | - | 20 | 30 |
| 85 | 50 | - | 35 | 15 |
| 95 | 45 | - | 55 | - |
| 100 | - | 25 | 75* | - |

* ผสมสี อิรีโทรซิน

1.2.3.3 สารตัวกลางที่ใช้ในการฝังเนื้อเยื่อเพื่อการตัด (embedding media) ได้แก่ พาราพลาสต์

1.2.3.4 น้ำยาสำหรับทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing reagent) ได้แก่ ไซลีน

1.2.3.5 น้ำยายึดเนื้อเยื่อพืชให้ติดแผ่นสไลด์ (adhesive) เตรียมสารละลายเข้มข้นโดยใช้ส่วนผสมของ

| | | |
|---|---|---|
| ไข่ขาว | 1 | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่น | 49 | มิลลิลิตร |

เมื่อจะใช้นำสารละลายเข้มข้น 1 มิลลิลิตร มาเติมน้ำกลั่นให้เป็น 50 มิลลิลิตร

1.2.3.6 สีย้อม ได้แก่ Dalafield's hematoxylin ซึ่งประกอบด้วย

| | | |
|---|---|---|
| แอมโมเนียม อลูมิเนียม ซัลเฟต (อิ่มตัวในน้ำ) | 400 | มิลลิลิตร |
| สีเฮมาทอกไซลิน | 4 | กรัม |
| เอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ | 25 | มิลลิลิตร |
| กลีเซอรีน | 100 | มิลลิลิตร |
| เมทธานอล | 100 | มิลลิลิตร |

1.2.3.7 ตัวกลางสำหรับปิดแผ่นสไลด์ (mounting media) คือ canada balsam (Merck)

1.3 วิธีการทดลอง

1.3.1 วิธีการปลูกดองดึง

นำหัวพันธุ์ดองดึงขนาดยาว 7-11 เซนติเมตร ที่ผ่านการกระตุ้นให้งอกด้วยวิธีแช่หัวดองดึงในน้ำที่มีการให้ฟองอากาศตลอดเวลา (นันทิรา, 2533) มาปลูกในถังขนาดความจุ 20 ลิตร ที่บรรจุสารละลายธาตุอาหาร Hoagland and Arnon (ตารางที่ 1) ตามกรรมวิธีที่กำหนด ยึดหัวพันธุ์ให้ติดกับตะกร้าด้วยฟองน้ำ ปลูกดองดึง 3 ต้น/ตะกร้า จากนั้นต่อสายยางอากาศเข้าไปในถัง (ภาพที่ 3) ศึกษาความเข้มข้นของไนโตรเจนจำนวน 4 กรรมวิธี คือ

| | | |
|---|---|---|
| กรรมวิธีที่ 1 ไนโตรเจนความเข้มข้น | 0 | มิลลิกรัมต่อลิตร |
| กรรมวิธีที่ 2 ไนโตรเจนความเข้มข้น | 210 | มิลลิกรัมต่อลิตร (กรรมวิธีควบคุม) |
| กรรมวิธีที่ 3 ไนโตรเจนความเข้มข้น | 420 | มิลลิกรัมต่อลิตร |
| กรรมวิธีที่ 4 ไนโตรเจนความเข้มข้น | 630 | มิลลิกรัมต่อลิตร |

สำหรับธาตุอาหารอื่นพืชได้รับในปริมาณที่เท่ากันจากสูตรสารละลายในตารางที่ 1 คือ P 31 K 234 Ca 160 Mg 48 B 1.01 Mo 0.02 Cu 0.04 Mn 1.01 Zn 0.11 และ Fe 4.40 มิลลิกรัมต่อลิตร

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) จำนวน 4 กรรมวิธี ๆ ละ 5 ซ้ำ 3 ต้นต่อซ้ำ

ก

ข

ภาพที่ 2 ดองดึงปลูกในถังสารละลายธาตุอาหาร

(ก การเจริญเติบโตทางลำต้น ข ระยะออกดอก)

1.3.2 วิธีย่อยและสกัดไนโตรเจน กรดอะมิโน โปรตีน และโคลชิซีน ทำการเก็บตัวอย่างในระยะการเจริญเติบโตต่างกัน 4 ระยะ คือ ระยะที่ 1) หลังปลูก 29 วัน ระยะที่ 2) หลังปลูก 49 วัน ระยะที่ 3) ระยะออกดอก และระยะที่ 4) ระยะพักตัว โดยวิเคราะห์ในส่วนต่างๆ ของพืช คือ ใบ หัว และราก ใช้ตัวอย่าง 3 ซ้ำต่อกรรมวิธี

1.3.2.1 วิธีการย่อยตัวอย่างพืชเพื่อวิเคราะห์ไนโตรเจนโดยวิธี Modified Kjeldahl's Method ดัดแปลงโดย Ohyama *et al.*, 1991

ชั่งตัวอย่างพืชอบแห้งที่บดละเอียด 0.05 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร ปิดหลอดด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำไปปั่นให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 1 คืน ใช้กรดธรรมดาเป็น Blank และวันต่อมานำมาย่อยที่เตาย่อยตัวอย่างพืชที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำหลอดออก วางทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์หลอดละ 0.3 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากัน นำมาย่อยต่อโดยปรับอุณหภูมิเป็น 230 องศาเซลเซียส จับเวลา 30 นาที สังเกตสีของสารละลาย หากสารละลายยังไม่ใสให้เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.2 มิลลิลิตรแล้วนำไปย่อยต่อ ทำซ้ำเดิมจนกระทั่งสารละลายใสจึงหยุด จากนั้นทิ้งให้เย็นแล้วเติมน้ำประมาณ 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมานำมาปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร ใส่ขวดพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

1.3.2.2 วิธีการสกัดตัวอย่างพืชด้วย เอทธานอล 80 เปอร์เซ็นต์

ชั่งตัวอย่างสด 2 กรัม สกัดด้วย เอทธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 6.4 มิลลิลิตร (แบ่งใส่ 3 ครั้ง) บดตัวอย่างให้ละเอียดในโกร่ง เทลงหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร ล้างตะกอนด้วยเอทธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือ 2 ครั้งปิดฝาหลอด ด้วย vinyl tape นำไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นนำไปแยกส่วนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แล้วเทส่วนสารละลายใสลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ล้างตะกอนด้วยเอทธานอล 80 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปแยกส่วนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง จากนั้นเทสารละลายใสลงในขวดปรับปริมาตรเดิม ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง ปรับปริมาตรให้ได้ปริมาตรครบ 25 มิลลิลิตร สารสกัดส่วนนี้ใช้สำหรับวิเคราะห์กรดอะมิโน ส่วนกากที่เหลือนำไปอบแห้งเพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

1.3.2.3 วิธีการสกัดตัวอย่างพืชเพื่อหาปริมาณโปรตีน

นำตัวอย่างที่อบแห้งจากข้อ 1.3.2.2 มาชั่ง และจดบันทึกน้ำหนักแห้ง จากนั้นบดตัวอย่างในโกร่งให้ละเอียด แล้วใส่ลงในหลอดเซนติฟิวจ์ เติม PBS ( เตรียมสารละลายเข้มข้น PBS จาก $NaH_2PO_4.2H_2O$ 62.404 กรัม/น้ำ 1 ลิตร ผสม $Na_2HPO_4.12H_2O$ 143.256 กรัม/น้ำ 1 ลิตร ปรับ pH ให้ได้ 6.8 ) 10 มิลลิลิตร นำไปแยกส่วนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว

สูงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาทีนำสารละลายส่วนใสใส่ในขวดปรับปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำซ้ำโดยล้างตะกอนด้วย PBS 5 มิลลิลิตร 2 ครั้ง ปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตรด้วย PBS

1.3.2.4 การสกัดพืชเพื่อหาปริมาณโคลชิซิน (บุญญรัตน์, 2539)

1.3.2.4.1 การสกัดตัวอย่างจากหัว

หั่นหัวสดละเอียดชั่ง 1.00 กรัม ใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่เติมเมธานอลลงไป 70 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปสกัดในอัลตราโซนิก บาธ ที่อุณหภูมิ 40 องศา-เซลเซียส นาน 45 นาที ตั้งทิ้งไว้จนนอนก้น รินส่วนใสเก็บไว้ เติมเมธานอลจำนวน 30 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วรูปชมพู่ที่มีส่วนตะกอนอยู่ นำไปสกัดในอัลตราโซนิกบาธ อีกครั้ง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ตั้งทิ้งไว้จนนอนก้น รินส่วนใสเติมลงในส่วนที่เก็บไว้ในตอนแรก กรองสารที่ได้ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ของ Whatmann$^{R}$ แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยเมธานอลในขวดปริมาตร

1.3.2.4.2 การสกัดตัวอย่างจากเมล็ด

นำเมล็ดแห้งมาบดละเอียดชั่ง 0.30 กรัม ใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่เติมปิโตรเลียม อีเธอร์ลงไป 100 มิลลิลิตร นำไปสกัดในอัลตราโซนิก บาธ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที รินปิโตรเลียม อีเธอร์ทิ้ง แล้วเติมเมธานอลลงไป 70 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปสกัดและเตรียมเป็นสารตัวอย่างด้วยขั้นตอนแบบเดียวกับที่ใช้ในการสกัดและเตรียมสารตัวอย่างจากหัว

1.3.3 วิธีวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน กรดอะมิโน โปรตีน และโคลชิซีน

1.3.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนโดยวิธี Indolphenol Method

1.3.3.1.1 เตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ไนโตรเจน

สารละลาย A ชั่ง EDTA.2Na 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายระหว่างเอทธานอล 60 เปอร์เซ็นต์ และ เมทธิลเรด 0.25 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 20 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 10 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ คนให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

สารละลาย B ชั่ง $KH_2PO_4$ 136.09 กรัม และ กรดเบนโซอิค 2.7 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

สารละลาย C ชั่ง โซเดียม ไนโตรพรัสไซด์ 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นเติมฟีนอล 10.25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร เก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 2 สัปดาห์

สารละลาย D ชั่ง $Na_2HPO_4.7H_2O$ 7.06 กรัม $Na_3PO_4.12H_2O$ 31.8 กรัม และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นเติมโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร เก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 2 สัปดาห์

1.3.3.1.2 เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล์ เพื่อปรับความเป็นกรดด่าง

1.3.3.1.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานจาก แอมโมเนียมซัลเฟต ที่ระดับความเข้มข้น 0-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

1.3.3.1.4 ดูดตัวอย่างที่ย่อยจากข้อ 1.3.2.1 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย A 0.5 มิลลิลิตร และสารละลาย B 0.5 มิลลิลิตร นำมาไตเตรท โดยหยดโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล์ ลงไป เขย่าเล็กน้อยให้สีเปลี่ยน จากนั้น เติมสารละลาย C 2.5 มิลลิลิตร และสารละลาย D 2.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร บันทึกผล แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานตามกฎของ Beer's-Lambert's Law จากนั้นนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ตามสูตรคือ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างพืช (มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง)} = \frac{\text{สาร A (ppm)} \times B \times C}{1000 \times DW}$$

A = ค่าความเข้มข้นของไนโตรเจนในสารละลายตัวอย่างพืชจากกราฟมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อลิตร)

B = อัตราส่วนการเจือจางสารตัวอย่างในปฏิกิริยา Indolphenol

C = ปริมาตรสุดท้ายของการย่อยตัวอย่างพืชในข้อ 1.3.2.1

DW = น้ำหนักแห้ง

1.3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดโดยวิธี Ninhydrin reaction method

1.3.3.2.1 เตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์กรดอะมิโน

- สารละลายนินไฮดริน : ชั่ง นินไฮดริน 0.958 กรัม ใส่ลงใน เมททอกซี่เอทธานอล 100 มิลลิลิตร และเติมกรดแอสคอบิค 33.4 มิลลิกรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่น 3.2 มิลลิลิตร นำไปวางบนเตาอุ่นความร้อนและคนจนกระทั่งละลาย

- ซิตริคบัฟเฟอร์ : ชั่งกรดซิตริค 56 กรัม และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 21.3 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

1.3.3.2.2 เตรียมเอทธานอล 60 เปอร์เซ็นต์

1.3.3.2.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานจาก แอสพาราจีน 188 มิลลิกรัม กลูตามีน 183 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร โดยใช้ความเข้มข้นระหว่าง 0-10 มิลลิโมล เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

1.3.3.2.4 ดูดสารสกัดเนื้อเยื่อพืชจากข้อ 1.3.2.2 จำนวน 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดแก้ว จากนั้นใส่ซิตริคบัฟเฟอร์ 1.5 มิลลิลิตร และ สารละลายนินไฮดริน 1.2 มิลลิตร ปั่นให้เข้ากัน แล้วปิดหลอดด้วยอะลูมินัมฟอยล์ นำหลอดแก้วไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เติมเอทธานอล 60 เปอร์เซ็นต์ 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร บันทึกผล แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานตามกฎของ Beer's-Lambert's Law จากนั้นนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณกรดอะมิโน (มิลลิโมลต่อกรัมน้ำหนักสด) ตามสูตรคือ

$$\text{ปริมาณกรดอะมิโน (มิลลิโมลต่อกรัมน้ำหนักสด)} = \frac{\text{สาร A มิลลิโมล} \times B \times C}{FW}$$

สาร A = ค่าความเข้มข้นของกรดอะมิโนในสารละลายตัวอย่างพืชจากกราฟมาตรฐาน (มิลลิโมล)

B = อัตราส่วนการเจือจางสารตัวอย่างใน Ninhydrin reaction method

C = ปริมาตรสุดท้ายของการสกัดเนื้อเยื่อพืชในข้อ 1.3.2.2

FW = น้ำหนักสดตัวอย่างที่ใช้สกัด (กรัม)

1.3.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยวิธี Lowry's method

1.3.3.3.1 เตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์โปรตีน

สารละลาย A เตรียมคอปเปอร์ซัลเฟต 1 เปอร์เซ็นต์

สารละลาย B เตรียมโพแทสเซียมตาร์เตรท 2 เปอร์เซ็นต์

สารละลาย C เตรียมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์

สารละลาย D เตรียมโซเดียมคาร์บอเนต 4 เปอร์เซ็นต์

สารละลาย E เตรียมจากการผสมสารละลาย C 49 มิลลิลิตร กับสารละลาย D 49 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย A 1 มิลลิลิตร จากนั้น จึงใส่สารละลาย B 1 มิลลิลิตร ซึ่งสารละลาย E ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนทำการทดลอง

สารละลาย F เจือจาง Folin-Ciocalteau reagent ในอัตราส่วน 1:1 ด้วยน้ำกลั่น

1.3.3.3.2 เตรียมกราฟสารละลายมาตรฐาน โดยใช้ BSA ความเข้มข้นระหว่าง 0.05-0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

1.3.3.3.3 ดูดตัวอย่างสารสกัดเนื้อเยื่อพืชจากข้อ 1.3.2.3 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย E 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้นาน 10 นาที แล้วใส่สารละลาย F 0.25 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดเดิม เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร โดยใช้ Sample buffer เป็น Blank ทำตามขั้นตอนดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น บันทึกผล แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานตามกฎของ Beer's-Lambert's Law จากนั้นนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) ตามสูตรคือ

$$\text{ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด)} = \frac{\text{สาร A มิลลิกรัม} \times B \times C}{DW}$$

สาร A = ค่าความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายตัวอย่างพืชจากกราฟมาตรฐาน (มิลลิกรัม)

B = อัตราส่วนการเจือจางสารตัวอย่างใน Lowry's method

C = ปริมาตรสุดท้ายของการสกัดเนื้อเยื่อพืชในข้อ 1.3.2.3

DW = น้ำหนักแห้งตัวอย่างที่ใช้สกัด (กรัม)

1.3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณโคลชิซิน โดยวิธี TLC – densitometry's Method ( Kitcharoen and Eknamkul, 1993) ดำเนินการโดยห้องปฏิบัติการคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3.4 ศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของรากโดยวิธีของ Johansen ในปี 1940

เก็บตัวอย่างของรากเพื่อศึกษาผลของกรรมวิธีทดลองต่อปริมาณท่อลำเลียงน้ำ (xylem) โดยใช้วิธีการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาเนื้อเยื่อวิทยา paraffin embedding technique ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1.3.4.1 เก็บตัวอย่างรากลงในขวดแก้วที่บรรจุน้ำยา FAA เพื่อหยุด การทำงานของเซลล์และรักษาสภาพเซลล์

1.3.4.2 ดึงน้ำออกจากเซลล์ของเนื้อเยื่อด้วยน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจาก เซลล์ทั้ง 5 ระดับ ดังที่กล่าวไว้ในตารางที่ 2 จากนั้นนำเนื้อเยื่อลงแช่ใน TBA นาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปแช่ในน้ำยาที่มีส่วนผสมของ TBA และ พาราฟินเหลว ในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.3.4.3 นำเนื้อเยื่อไปแช่ในพาราพลาสต์ที่หลอมไว้ในขวดแก้วขนาดเล็ก นำไปเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เพื่อให้พาราพลาสต์ ซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อ เมื่อพร้อมที่จะตัดเนื้อเยื่อจึงนำไปฝังในพาราพลาสเพื่อการตัดเนื้อเยื่อต่อไป

1.3.4.4 ติดแท่งพาราพลาสต์ที่ฝังเนื้อเยื่อแล้วบนแท่งไม้ที่อิ่มตัวด้วยพาราพลาสต์ ตัดชิ้นส่วนพืชโดยใช้เครื่องตัดชิ้นส่วนพืชแบบล้อหมุน ให้ชิ้นส่วนพืชมีความหนา 13-15 ไมครอน

1.3.4.5 นำชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชที่ตัดได้มาติดบนแผ่นกระจกสไลด์ โดยใช้น้ำยายึดเนื้อเยื่อพืชเป็นตัวยึดให้ติดกับสไลด์ พร้อมกับวางสไลด์บนแผ่นให้ความร้อน เมื่อแผ่นริบบอนติดแน่นบนแผ่นสไลด์ดีแล้วจึงนำชิ้นส่วนไปละลายพาราพลาสต์ออกจากเนื้อเยื่อ และทำความสะอาดเนื้อเยื่อโดยแช่ในไซลีน

1.3.4.6 ย้อมด้วยสี Delafield's hematoxylin ปิดกระจกสไลด์ด้วย canada balsam เพื่อยึดแผ่นปิดสไลด์ถาวร แล้วนำเนื้อเยื่อไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพเนื้อเยื่อตามความเหมาะสม

1.4 บันทึกผลการทดลอง

1.4.1 การเจริญเติบโต

1.4.1.1 ความสูงของต้น (เซนติเมตร) วัดจากโคนต้นถึงปลายใบที่สูงที่สุด สัปดาห์ละ 1 ครั้ง

1.4.1.2 จำนวนดอกต่อต้น

1.4.1.3 จำนวนฝักต่อต้น

1.4.1.4 ขนาดของหัว (เซนติเมตร)

1.4.1.5 น้ำหนักของหัว (กรัม)

1.4.2 ปริมาณไนโตรเจน และสารประกอบไนโตรเจน

1.4.2.1 ความเข้มข้นและปริมาณไนโตรเจน ในใบ หัว และราก

1.4.2.2 ความเข้มข้นและปริมาณกรดอะมิโน ในใบ หัว และราก

1.4.2.3 ความเข้มข้นและปริมาณโปรตีนใน ใบ หัว และราก

1.4.2.4 ความเข้มข้นและปริมาณโคลชิซีนใน ใบ หัว และเมล็ด

1.4.3 จำนวนกลุ่มเซลล์ลำเลียงน้ำ

**การทดลองที่ 2** ผลของไนเตรท และ แอมโมเนียม ต่อการเจริญเติบโต และปริมาณสารประกอบไนโตรเจน

2.1 วัสดุและอุปกรณ์ในการทดลอง

2.1.1 พืชทดลองและอุปกรณ์ในการปลูกดองดึง

2.1.1.1 หัวพันธุ์ดองดึงยาว 7-12 เซนติเมตร

2.1.1.2 ถังน้ำขนาด 20 ลิตร จำนวน 20 ถัง

2.1.1.3 เชือกไนลอนสำหรับทำตาข่าย

2.1.1.4 ตะกร้าพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 29.5 เซนติเมตร ลึก 10.5 เซนติเมตร

2.1.1.5 น้ำ deionize

2.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน กรดอะมิโน โปรตีน โคลชิซีน และในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

2.2 สารเคมีในการทดลอง

2.2.1 สารเคมีในการเตรียมสารละลาย โดยใช้ปริมาณเจือจางตามสูตรของ Hoagland and Arnon ในปี 1950 (Jones, 1997) ดังแสดงในตารางที่ 3

**ตารางที่ 3** องค์ประกอบของสารละลายธาตุอาหารในการทดลองที่ 2

| สารละลายเข้มข้น | ปริมาณเจือจาง (มิลลิลิตร/ลิตร) |
|---|---|
| ธาตุอาหารหลัก | |
| 1.0 โมลาร์ โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต ($KH_2PO_4$) | 1.0 |
| 1.0 โมลาร์ แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NH_4H_2PO_4$) | 1.0 |
| 1.0 โมลาร์ โพแทสเซียมไนเตรท ($KNO_3$) | 6.0 |
| 1.0 โมลาร์ แคลเซียมไนเตรท [$Ca(NO_3)_2.4H_2O$] | 4.0 |
| 1.0 โมลาร์ แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) | 2.0 |
| 0.5 โมลาร์ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ [$Ca(OH)_2$] | 4.0 |
| 1.0 โมลาร์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) | 6.0 |
| 1.0 โมลาร์ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ($NH_4OH$) | 14.0 |
| ธาตุอาหารรอง | |
| 0.05 โมลาร์ บอริค แอซิด ($H_3BO_3$) | 2.0 |
| 0.009 โมลาร์ แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$) | 2.0 |
| 0.0008 โมลาร์ ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.5H_2O$) | 2.0 |
| 0.0003 โมลาร์ คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) | 2.0 |
| 0.0001 โมลาร์ โมลิปเดต แอซิด ($H_2MoO_4.H_2O$) | 2.0 |
| 0.5 เปอร์เซ็นต์ เหล็กคีเลต (FeEDTA) | 6.0 |

2.2.2 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ไนโตรเจน กรดอะมิโน โปรตีน โคลชิซีน และ สารเคมีในการเตรียมเนื้อเยื่อพืชที่ใช้ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 วิธีการปลูกดองดึง

ปลูกดองดึงในถังขนาด 20 ลิตร ในสารละลายธาตุอาหารดังแสดงในตารางที่ 3 โดยปรับชนิดและความเข้มข้นของไนโตรเจนตามกรรมวิธีที่กำหนด ใช้หัวพันธุ์ยาว 7-12 เซนติเมตร โดยเปรียบเทียบการใช้ไนโตรเจนในรูปของ ไนเตรท และ/หรือ แอมโมเนียม จำนวน 3 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไนโตรเจนในรูป $NO_3^-$ 196 + $NH_4^-$ 14 มิลลิกรัมต่อลิตร (กรรมวิธีควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 ไนโตรเจนในรูป $NO_3^-$ 210 + $NH_4^-$ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 3 ไนโตรเจนในรูป $NO_3^-$ 0 + $NH_4^-$ 210 มิลลิกรัมต่อลิตร

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 3 กรรมวิธีๆ ละ 5 ซ้ำ 3 ต้นต่อซ้ำ

2.3.2 วิธีการย่อย สกัด วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน กรดอะมิโน โปรตีน และโคลชิซีน การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของราก และบันทึกผลการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

**สถานที่ทำการวิจัย**

1. โรงเรือนปลูกพืชไร้ดิน ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

**ระยะเวลาที่ทำการวิจัย**

เดือน พฤษภาคม 2544 ถึง เดือน พฤษภาคม 2545