บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

1. พืชทดลอง

ผลกล้วยหอมทอง [*Musa* (AAA group, Cavendish subgroup) 'Hom Thong'] ที่มีความแก่ประมาณ 70 % โดยพิจารณาจากเหลี่ยมของกล้วย จากบริษัท โดล ไทยแลนด์ ซึ่งสามารถพิจารณามาตรฐานความแก่ของกล้วยโดยสังเกตจากเหลี่ยมผลได้ดังนี้ (เบญจมาศ ศิลาย้อย, 2534)

Full	คือผลที่ไม่มีเหลี่ยมเลย เรียกว่า แก่เต็มที่ 100%
Full ¾	คือผลที่มีเหลี่ยม แต่ไม่ชัดเจน มีความแก่ประมาณ 90%
Light Full ¾	คือผลที่มีเหลี่ยมชัด มีความแก่ประมาณ 80%
Light ¾	คือผลที่มีขนาดครึ่งหนึ่งของผลโตเต็มที่ หรือมีความแก่ประมาณ 70%

2. วัสดุอุปกรณ์

2.1 อุปกรณ์

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath), ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Growth chamber), ห้องควบคุมอุณหภูมิ (Phytotron), เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer), เครื่อง Gas chromatography (Shimadzu รุ่น GC-14A), เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge), เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge), เครื่อง Autoclave, ตู้อบ (Oven 180°C), ตู้อบ (Oven 80°C), ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง (Deep freezer) อุณหภูมิ -70°C, ตู้เย็นอุณหภูมิ -20°C, ตู้ควบคุมอุณหภูมิสำหรับทำ Hybridization (Hybridization oven), ชุดแยก DNA และ RNA ด้วยไฟฟ้า (DNA, RNA gel electrophoresis), เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่งของกรัม, เครื่องวัดค่าความแน่นเนื้อ (Penetrometer รุ่น FT 011), เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex mixer), แท่นให้ความร้อนและคนสาร (Hot plate & Stirrer), เครื่องปั่นน้ำผลไม้ (Blender), เครื่องวัดปริมาณ

Total Soluble Solids (TSS) (Refractometer รุ่น N-1E), แผ่นเทียบสี Royal Horticultural Society (R.H.S.) colour chart , ตารางแปลงค่าสี (R.H.S. Table of Cross-References), แผ่นเมมเบรน (Hybond N^+, Amersham Pharmacia Biotech UK Limited), Centrifuge tube screw cap ขนาด 50 มิลลิลิตร, Centrifuge tube screw cap ขนาด 15 มิลลิลิตร, หลอด microcentrifuge, ขวดโหลแก้วขนาด 2.4 ลิตร และขวดแก้วขนาด 20 มิลลิลิตร พร้อมจุกยาง, หลอดเก็บตัวอย่างสูญญากาศ (Vacuum tube), กระบอกฉีดยาและเข็มฉีดยา (Syringe and needle), กระบอกตวง, หลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร,ปาสเตอร์ปิเปต (Pasteur pipette), ไมโครปิเปตและทิป (Micropipette and tip), มีดและเขียง, กล่องกระดาษ, ตะกร้าพลาสติก, เทอร์โมมิเตอร์, นาฬิกาจับเวลา, อลูมิเนียม ฟอล์ย (Aluminium foil), โกร่งบด, ที่เจาะกระดาษลูกฟูกหนา 3 มิลลิเมตร กว้าง 26 เซนติเมตร ยาว 39.5 เซนติเมตร สูง 12 เซนติเมตร, กล้องถ่ายภาพโพลารอยด์, X-ray film (general purpose blue)

2.2 สารเคมี

Saturated NaCl (ใช้ในการเก็บตัวอย่างแก๊สเอทิลีน), 80% acetone, PPO extraction Buffer (ภาคผนวก), 0.05 M Potassium Phosphate (KPi) buffer (ภาคผนวก), 0.2 M Potassium Phosphate (KPi) buffer (ภาคผนวก), Pyrocatechol, ไนโตรเจนเหลวสำหรับแช่และบดตัวอย่าง, สารตรวจสอบโปรตีน (ชุดตรวจสอบ total protein ของบริษัท Clinaq), RNA extraction buffer (ภาคผนวก), 2-mercaptoethanol 10 M LiCl, 3 M Sodium acetate pH 5.2, Chloroform, Phenol, Phenol : Chloroform (1:1), Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1), 70% และ 100% Ethanol, Diethyl pyrocarbonate (DEPC), Agarose, 10x MOPS, Denaturing buffer, Loading dye for RNA, Ethidium bromide, 37% formaldehyde, 40% formamide, 20x SSC (Saline sodium citrate), ECL labelling and detection kit (Amersham Phamacia Biotech UK Limited), Primary wash buffer(ภาคผนวก), สารเคมีที่ใช้ในการล้างฟิล์ม (developer และ fixer)

3. วิธีการทดลอง

3.1 การศึกษาเพื่อหาอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการแช่น้ำร้อนกล้วยหอมทอง

3.1.1 วิธีการแช่น้ำร้อนและเก็บรักษาผลกล้วย

- นำหวีกล้วยหอมทองที่มีความแก่ประมาณ 70% มาทำการตัดแบ่งออกเป็นแต่ละผล
- นำผลกล้วยมาแช่น้ำร้อนใน water bath ที่อุณหภูมิ 45, 50, 55 °C และระยะเวลา 2, 10, 20 นาที ส่วนชุดการทดลองควบคุมแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที โดยในแต่ละชุดการทดลองมีจำนวน 4 ซ้ำ
- เช็ดผลกล้วยให้แห้งเก็บผลกล้วยในแต่ละการทดลองลงในกล่องกระดาษแล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่ห้องควบคุมอุณหภูมิ (25°C)
- เก็บผลการทดลองในวันที่ 0, 3, 6, 8, 10, 12, 14 และ 16 หลังจากวันที่ทำการแช่น้ำร้อน (หรือจนหมดอายุการเก็บรักษา) โดยบันทึกการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยาการสุกบางประการ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสด การผลิตเอทิลีน การเปลี่ยนสีของเปลือกกล้วย ปริมาณรงควัตถุ ความแน่นเนื้อของเนื้อกล้วย ปริมาณ Total soluble solids (TSS)

3.1.2 วิธีการวัดอัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสด

ชั่งน้ำหนักผลกล้วยในแต่ละชุดการทดลองด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง โดยเทียบน้ำหนักในวันที่ 0 เป็น 100%

3.1.3 วิธีการวัดอัตราการผลิตเอทิลีน

ชั่งน้ำหนักผลกล้วยแล้วนำผลกล้วยใส่ลงในขวดโหลแก้วสำหรับเก็บตัวอย่างแก๊สขนาด 2.4 ลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ใช้หลอดและเข็มฉีดยาดึงตัวอย่างแก๊สจากขวดโหลมาเก็บในหลอดสูญญากาศหรือเก็บแทนที่น้ำเกลือในขวดแก้วขนาด 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปตรวจวัดปริมาณแก๊สเอทิลีนด้วยเครื่อง gas chromatography ต่อไป

3.1.4 วิธีการวัดการเปลี่ยนสีของเปลือกกล้วย

วัดการเปลี่ยนสีของเปลือกกล้วยโดยเทียบกับ Royal Horticultural Society (R.H.S.) colour chart จากนั้นนำไปแปลงเป็นระบบ Y x y color space ด้วยตารางแปลงค่าสี (R.H.S. Table of Cross-Reference) ต่อมาแปลงเป็นระบบ L a b color space โดยใช้สูตร จากนั้นนำค่า a และ b มาคำนวณหาค่าการเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีเหลืองหรือ Hue value ต่อไป (รายละเอียดของแต่ละระบบและสูตรการคำนวณระบุในภาคผนวก)

3.1.5 วิธีการวัดปริมาณรงควัตถุ

วัดปริมาณรงควัตถุในเปลือกกล้วย โดยใช้ที่เจาะใบเจาะเปลือกกล้วยจำนวน 5 ชิ้น แบบสุ่ม ชั่งน้ำหนักสดด้วยเครื่องชั่ง จากนั้นแช่ชิ้นเปลือกกล้วยใน 80% acetone 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองที่ปิดสนิท เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามวิธีสกัดรงควัตถุของ อัญชลี ใจดี (2543) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Crafts-Brandner และคณะ (1984) และ Zhang และ Kirkham (1994) นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 645, 663 และ 700 นาโนเมตร คำนวณปริมาณรงควัตถุที่ได้โดยใช้สมการของ Blackbourn (1990) ดังนี้

$$\text{Total chlorophyll (mg/l)} = 20.2\ (A_{645} - A_{700}) + 8.02\ (A_{663} - A_{700})$$

3.1.6 วิธีการวัดความแน่นเนื้อของเนื้อกล้วย

วัดความแน่นเนื้อของผลกล้วยด้วยเครื่อง Penetrometer โดยใช้หัวกดขนาด 0.61 เซนติเมตร กดลงบนเนื้อกล้วยที่ปอกเปลือกออก โดยกดลึก 0.5 เซนติเมตร จำนวน 3 ครั้งต่อผล แปลงค่าความแน่นเนื้อที่ได้จากกิโลกรัมเป็นนิวตันโดยคูณด้วย 9.807 (Kader, 1982)

3.1.7 วิธีการวัดปริมาณ Total Soluble Solids (TSS)

วัดปริมาณ TSS ในผลกล้วย โดยปั่นเนื้อกล้วยกับน้ำกรอง อัตราส่วน 1 : 2 ด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ แล้วนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่อง Microcentrifuge นำสารละลายส่วนใสมาหยดลงบน Refractometer อ่านค่าที่ได้เป็นองศา

ปริมาณ TSS = °soluble solids ที่อ่านได้ x 3 (dilution factor)

3.1.8 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์สถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

3.2 การศึกษาถึงผลของการแช่น้ำร้อนร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำและผลของการแช่น้ำร้อนที่มีต่อเอนไซม์ PPO และยีน *hsp70* ของผลกล้วยหอมทองที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 14 °C

3.2.1 วิธีการแช่น้ำร้อนและเก็บรักษาผลกล้วย

- แช่น้ำร้อนผลกล้วยเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.1.1 โดยเลือกอุณหภูมิและช่วงเวลาในการแช่น้ำร้อนที่ให้ผลดีที่สุดในการชะลออายุการเก็บรักษาของกล้วยจากผลการทดลองในตอนที่ 1 มา 2 ชุดการทดลอง และชุดการทดลองควบคุม 1 ชุดการทดลอง โดยในแต่ละชุดการทดลองมีจำนวน 4 ซ้ำ เก็บผลการทดลองในวันที่ 0
- นำผลกล้วยไปเก็บรักษาไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 14°C แบ่งกล้วยในแต่ละชุดการทดลองออกเป็น 3 ส่วน เก็บแต่ละส่วนไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 1, 2 และ 3 สัปดาห์ตามลำดับ
- นำผลกล้วยออกมาไว้ที่อุณหภูมิ 25°C
- เก็บผลการทดลองในวันที่ 0, 3, 6, 8 และ 10 หลังจากนำออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (หรือจนหมดอายุการเก็บรักษา) โดยบันทึกการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยาการสุกบางประการ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสด การผลิตเอทิลีน การเปลี่ยนสีของเปลือกกล้วย ปริมาณรงควัตถุ ความแน่นเนื้อของเนื้อกล้วย ปริมาณ Total soluble solids (TSS) ตามวิธีการในข้อ 3.1.2 ถึง 3.1.7 ตามลำดับ รวมถึงผลต่อ activity ของเอนไซม์ PPO

3.2.2 วิธีการวัด activity ของเอนไซม์ PPO ในเปลือกกล้วย

- เก็บตัวอย่างเปลือกกล้วย โดยชั่งน้ำหนักสดประมาณ 1.5 กรัม นำไปแช่ลงในไนโตรเจนเหลวทันทีและรวบรวมตัวอย่างเก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่มีอุณหภูมิ -70°C
- เมื่อรวบรวมตัวอย่างได้ครบแล้ว ทำการวิเคราะห์ activity ของเอนไซม์ PPO โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Montgomery และ Sgarbiery

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(1975) (วิธีการวิเคราะห์โดยละเอียดระบุในภาคผนวก)

- วัดปริมาณโปรตีนด้วยชุดตรวจสอบ total protein ของบริษัท Clinaq (วิธีการวิเคราะห์โดยละเอียดระบุในภาคผนวก)
- คำนวณ 1 หน่วย (unit) ของ activity ของเอนไซม์เท่ากับค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไป 0.001 หน่วยต่อ 1 นาที เทียบกับปริมาณโปรตีน (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Montgomery และ Sgarbiery, 1975)

3.2.3 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์สถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

3.2.4 การศึกษาการแสดงออกของยีน *hsp70* ในเปลือกกล้วยหอมทอง

- เก็บตัวอย่างเปลือกกล้วยในวันที่ 0 และในวันแรกหลังจากนำออกมาจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 14°C ของแต่ละชุดการทดลอง โดยชั่งน้ำหนักสดประมาณ 5 กรัม นำไปแช่ลงในไนโตรเจนเหลวทันทีและรวบรวมตัวอย่างเก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่มีอุณหภูมิ -70°C
- สกัด RNA จากเปลือกกล้วยโดยดัดแปลงจากวิธีของ Asif และคณะ (2000) (ตามวิธีการดังแสดงในภาคผนวก)
- แยกแถบ mRNA ด้วยเครื่องแยก RNA ด้วยกระแสไฟฟ้า โดยใช้ 1% formaldehyde gel ใน RNA running buffer (1x MOPS) ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 20 นาที
- นำ RNA ที่ได้มาวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *hsp70* โดยวิธี Northern blot analysis ใช้ *hsp70* cDNA ของ *Arabidopsis* เป็น Probe