บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุและอุปกรณ์

1. ต้นส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่ อายุ 6 ปี จำนวน 18 ต้น
2. ฮอร์โมน GA_3 บริสุทธิ์ 100 เปอร์เซ็นต์
3. สารเคมีที่ใช้เป็นตัวทำละลาย GA_3 ได้แก่ เอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไฮดรอกไซด์
4. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหาร ได้แก่ กรดซาลิไซลิค กรดซัลฟูลิค กรดไนตริก และเปอร์คลอริค
5. เครื่องบดตัวอย่างพืช
6. ตู้อบ
7. เครื่องวิคราะห์ธาตุอาหาร (Atomic Absoption Spectrophotometer)
8. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
9. เครื่องย่อย (Kjeldahl digestion unit) และเครื่องกลั่นไนโตรเจน (Distilling unit)
10. ถุงพลาสติกใช้เก็บตัวอย่าง
11. อุปกรณ์ฉีดพ่นสารละลาย ได้แก่ กระบอกฉีดสารละลาย กระบอกตวง
12. ป้ายเครื่องหมายและสมุดบันทึก
13. เครื่องมือวัดการเจริญเติบโตของผล ได้แก่ เครื่องชั่ง เครื่องวัดละเอียด
14. กล้องถ่ายรูปพร้อมฟิล์มสี

วิธีการ

ใช้แปลงปลูกส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่ของเกษตรกรที่ปลูกด้วยกิ่งตอน อายุ 6 ปี มีการดูแลรักษา ให้น้ำ ให้ปุ๋ย และมีการควบคุมกำจัดศัตรูพืชอย่างสม่ำเสมอ คัดเลือกจากต้นที่มีขนาดทรงพุ่มและการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน ให้ผลผลิตมาแล้ว 2 ปี จำนวน 18 ต้น ดำเนินการศึกษาในช่วงเดือนมีนาคม-พฤษภาคม พ.ศ. 2541 และในช่วงเดือนสิงหาคม-ตุลาคม พ.ศ. 2543 โดยแบ่งการศึกษาได้ดังนี้

1. อิทธิพลของกรดจิบเบอเรลลิค (GA_3) ต่อการติดผลของส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่

เป็นการศึกษาอิทธิพลของ GA_3 ความเข้มข้น 100 ppm ตามระยะการพัฒนาของดอกที่เหมาะสมต่อการติดผลของส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่ โดยทำการศึกษาในช่วงเดือนมีนาคม-พฤษภาคม พ.ศ. 2541 ซึ่งการกำหนดระดับความเข้มข้นของ GA_3 เป็น 100 ppm เนื่องจากผลการศึกษาของ มนตรี ศรีอุทัย (2539) และจักรพงษ์ จิระแพทย์ (2540) พบว่า GA_3 ความเข้มข้น 100 ppm มีผลทำให้ส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่ให้ค่าการติดผลสูงสุด

การเตรียม Stock solution ของ GA_3 ให้ได้ความเข้มข้น 1,000 ppm โดยใช้ GA_3 เข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ หนัก 0.2 กรัม ละลายด้วยเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ กับ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 นอมอล ปริมาณเล็กน้อย จากนั้นนำไปผสมกับน้ำปริมาตร 200 มิลลิลิตร จะได้ GA_3 ความเข้มข้น 1,000 ppm ส่วนการเตรียมสารละลาย GA_3 ความเข้มข้น 100 ppm เตรียมจาก Stock solution ความเข้มข้น 1,000 ppm โดยใช้ปิเปตดูดสารมา 30 มิลลิลิตร ใส่ลงในกระบอกฉีดพ่นแล้วเติมน้ำสะอาดลงไป 270 มิลลิลิตร จะได้ GA_3 ความเข้มข้น 100 ppm ปริมาณ 300 มิลลิลิตร

เมื่อช่อดอกของต้นส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่ที่คัดเลือกไว้มีการพัฒนาถึงระยะที่ต้องการศึกษา (รูปที่ 1) ทำการคัดเลือกช่อดอกที่มีจำนวนของดอกไล่เลี่ยกัน จำนวน 40 ช่อดอกต่อต้น ใช้จำนวนดอกทั้งหมด 800-1,000 ดอกต่อหน่วยทดลอง บันทึกจำนวนดอกในแต่ละช่อ และทำเครื่องหมายช่อดอก จากนั้นทำการฉีดพ่น GA_3 ความเข้มข้น 100 ppm แยกเป็น 6 หน่วยทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) มีระยะการพัฒนาของดอกดังนี้

1. หน่วยควบคุม (control) ไม่ฉีดพ่น GA_3
2. การฉีดพ่น GA_3 ในระยะก่อนดอกบาน 5-7 วัน
3. การฉีดพ่น GA_3 ในระยะก่อนดอกบาน 2-3 วัน

4. การฉีดพ่น GA_3 ในระยะดอกบาน

5. การฉีดพ่น GA_3 ในระยะหลังดอกบาน 2-3 วัน

6. การฉีดพ่น GA_3 ในระยะหลังดอกบาน 5-7 วัน

รูปที่ 1 ลักษณะของดอกส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่ที่มีการพัฒนาแตกต่างกัน

ก. ระยะก่อนดอกบาน 5-7 วัน ข. ระยะก่อนดอกบาน 2-3 วัน

ค. ระยะดอกบาน ง. ระยะหลังดอกบาน 2-3 วัน

จ. ระยะหลังดอกบาน 5-7 วัน

ทำการฉีดพ่น GA_3 ให้ทั่วทั้งช่อดอกในปริมาณที่เหมาะสมในช่วงเวลา 07.00-10.00 นาฬิกา เพื่อให้ GA_3 ซึมเข้าในดอกได้ดีขึ้น ส่วนหน่วยควบคุมไม่ต้องฉีดพ่นสารใด ๆ

สังเกตและบันทึกค่าการติดผล ภายหลังจากดอกบานไปแล้ว 3 วัน ซึ่งเป็นระยะการติดผล (ไมตรี แก้วทับทิม, 2539) เป็นประจำทุกสัปดาห์ต่อเนื่องกันไปจนไม่เกิดการร่วงของผลอ่อน (ประมาณ 6 สัปดาห์) นำค่าการติดผลมาคิดเป็นการติดผลเฉลี่ยต่อหน่วยทดลองในแต่ละระยะการตรวจวัด

$$\text{การติดผล (\%)} = \frac{\text{จำนวนผลที่ติด}}{\text{จำนวนดอกทั้งหมด}} \times 100$$

2. อิทธิพลของกรดจิบเบอเรลลิค (GA_3) ต่อการพัฒนาผลอ่อนของส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่

นำผลการศึกษาอิทธิพลของกรดจิบเบอเรลลิค (GA_3) ต่อการติดผลของส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่ที่ให้ผลการทดลองสูงสุดใช้เป็นหน่วยทดลองเปรียบเทียบการพัฒนาของผลอ่อนในระยะต่าง ๆ กับหน่วยควบคุมที่ไม่มีการฉีดพ่น GA_3 หรือการติดผลตามธรรมชาติ โดยคัดเลือกต้นส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่ที่มีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันจำนวน 8 ต้น แบ่งเป็นหน่วยควบคุม (control) จำนวน 4 ต้น และหน่วยทดลองที่ได้รับ GA_3 ความเข้มข้น 100 ppm จำนวน 4 ต้น ทำการศึกษาในช่วงเดือนสิงหาคม-ตุลาคม พ.ศ. 2543 วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) มี 4 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย Least Significant Difference (LSD)

เมื่อช่อดอกมีการเจริญเติบโตถึงระยะที่เหมาะสมแล้ว คัดเลือกช่อดอกจากกิ่งที่มีขนาดใกล้เคียงกัน จำนวนใบไม่น้อยกว่า 4 ใบ และมีจำนวนดอกไล่เลี่ยกันประมาณ 4-15 ดอกต่อช่อ บันทึกจำนวนดอกต่อช่อ และทำเครื่องหมายช่อดอก การคัดเลือกช่อดอกให้มีการกระจายตัวทั่วทั้งทรงพุ่ม จากนั้นทำการฉีดพ่นช่อดอกด้วย GA_3 ความเข้มข้น 100 ppm ส่วนหน่วยควบคุมไม่ต้องฉีดพ่นสารใด ๆ จำนวนช่อดอกที่ใช้ทั้งหมด 40 ช่อต่อต้น รวมใช้ช่อดอก 160 ช่อดอกต่อหน่วยทดลอง

ภายหลังดอกบานไปแล้วหนึ่งสัปดาห์ให้สุ่มช่อดอกมาจำนวน 4 ช่อดอกต่อต้น โดยเก็บให้กระจายทั่วทรงพุ่มรวม 16 ช่อดอกต่อหน่วยทดลอง ทำการวัดขนาดของผลอ่อนภายในช่อดอกด้วยเครื่องวัดละเอียด พร้อมกับทำเครื่องหมายให้กับแต่ละผล หาค่าเฉลี่ยขนาดของผลอ่อน เก็บผลอ่อนภายในช่อที่มีขนาดใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ยมากที่สุด 8 ผลต่อต้น รวม 32 ผลต่อหน่วยทดลอง บรรจุในถุงกระดาษ นำตัวอย่างไปศึกษาการเจริญเติบโตภายในผลที่ห้องปฏิบัติการต่อไป โดยจัดเก็บตัวอย่างเป็นรายสัปดาห์ต่อเนื่องกันไปจนครบ 6 สัปดาห์

2.1 การวัดการเจริญเติบโตและการพัฒนาของผลอ่อนในแต่ละหน่วยทดลอง เมื่อนำตัวอย่างมาถึงห้องปฏิบัติการมีการปฏิบัติและบันทึกค่าการตรวจวัดต่าง ๆ คือ การเจริญเติบโตของผลอ่อนในแต่ละหน่วยทดลอง โดยชั่งน้ำหนักสดของผลอ่อนด้วยเครื่องชั่ง ทำการวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลาง และความยาวของผล ด้วยเครื่องวัดละเอียด

2.2 การพัฒนาของส่วนต่าง ๆ ภายในผล โดยผ่าผลอ่อนตามขวาง เพื่อวัดความหนาของเปลือกผล และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของกลีบผล ด้วยเครื่องวัดละเอียด พร้อมถ่ายรูปบันทึกภาพไว้เปรียบเทียบการเจริญเติบโตทุกระยะการตรวจวัด

2.3 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงปริมาณธาตุ N, P และ K ในส่วนของใบและผลอ่อน ภายหลังจากวัดค่าการเจริญเติบโตเสร็จแล้วให้นำตัวอย่างผลอ่อนที่เก็บจากรอบทรงพุ่มของแต่ละต้นรวมเข้าด้วยกัน (รวม 4 ผลต่อต้น) บรรจุลงถุงกระดาษปากเปิดพร้อมทำเครื่องหมาย สำหรับตัวอย่างส่วนของใบนั้นให้ใช้ใบที่มีความสมบูรณ์ปราศจากโรคและแมลงรบกวนเก็บใบในตำแหน่งที่ 2-4 จากปลายช่อเข้ามา และเก็บจากช่อดอกที่สุ่มเก็บผลอ่อนทั้ง 4 ช่อดอกของแต่ละต้น (รวม 4 ใบต่อต้น) โดยเก็บในวันเวลาเดียวกันกับการเก็บผลอ่อน ทำความสะอาดใบ นำตัวอย่างใบที่เก็บจากแต่ละต้น รวมเข้าด้วยกันแล้วบรรจุลงถุงกระดาษปากเปิด ทำเครื่องหมายให้แต่ละตัวอย่าง

นำตัวอย่างส่วนของใบและผลอ่อนของแต่ละหน่วยทดลองที่บรรจุในถุงกระดาษปากเปิดไปอบแห้งด้วยตู้อบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง หลังจากตัวอย่างแห้งสนิทแล้วนำตัวอย่างไปบดด้วยเครื่องบดละเอียด เพื่อให้ชิ้นส่วนต่าง ๆ มีโอกาสเป็นตัวแทนในการวิเคราะห์มากที่สุด รวมตัวอย่างที่บดได้ทั้งหมดเป็นส่วนของใบ 8 ตัวอย่าง และส่วนของผลอ่อน 8 ตัวอย่างเช่นกัน จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหาร N, P และ K ด้วยวิธีของหน่วยปฏิบัติการวิเคราะห์กลาง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (อ้างโดย อิสริยาภรณ์ สุวรรณชาตรี, 2539) ดังนี้

- ธาตุไนโตรเจน (N)

การย่อยตัวอย่างพืช โดยใช้วิธี Kjeldahl digestion โดยนำตัวอย่างพืชไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นชั่งตัวอย่างพืชปริมาณ 0.2 กรัม ใส่ในหลอดย่อย (Kjeldahl digestion tube) ใส่สารเร่งปฏิกริยา จำนวน 1 เม็ดต่อหลอด เติมกรดย่อย 2.5 % salicylic acid ใน H_2SO_4 (Conc.) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า วางทิ้งไว้ 20 นาที เติม sodium thiosulfate ปริมาณ 0.5 กรัม เขย่าให้เข้ากันวางทิ้งไว้อย่างน้อย 2 ชั่วโมง นำไปย่อยจนได้สารละลายที่ใส จัดทำ Blank โดยย่อยกรดพร้อม ๆ กับตัวอย่างพืช โดยไม่ใส่ตัวอย่างพืช หลังจากนั้นทำการกลั่นและไตเตรด เพื่อหาปริมาณไนโตรเจน โดยเติมสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ลงไปประมาณ 50 มิลลิลิตร ทำการกลั่นและจับก๊าซแอมโมเนีย (NH_3) ที่เกิดขึ้นด้วย H_3BO_3 ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ สารละลายจะเปลี่ยนจากสีแดงม่วงเป็นสีเขียว กลั่นให้ได้สารละลายประมาณ 150 มิลลิลิตร หรือประมาณ 5 นาที นำสารละลายที่ได้ใน Erlenmeyer flask titrate มาไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรด H_2SO_4 บันทึกปริมาณสารละลายกรดที่ใช้ คำนวณปริมาณไนโตรเจนโดยสูตร

ไนโตรเจน (%) = 14 x N x V x A 100/W x B

A =ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ได้จาการย่อยทั้งหมดหลังจากปรับปริมาตรแล้ว

B =ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่นำมากลั่น

N =ความเข้มข้นเป็นนอร์มอลของสารละลายมาตรฐาน กรด H_2SO_4

V =ปริมาตรสารละลายมาตรฐานกรด ที่ใช้ในการไตเตรท blank แล้ว

W =น้ำหนักตัวอย่างพืชที่นำมาวิเคราะห์ (มิลลิกรัม)

- ธาตุฟอสฟอรัส (P) และ โปแตสเซียม (K)

การย่อยตัวอย่าง โดยใช้ส่วนผสมของกรดไนตริก และไฮเปอร์คลอริค (NHO_3 /$HClO_4$) [HNO_3 (Conc.) 1,250 ml + $HClO_4$ (Conc.) 250 ml + 0.06 Ammonium metavanadate (NH_4VO_3)] นำตัวอย่างพืชมาอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง ชั่งตัวอย่างพืชที่ผ่านการอบแล้ว 0.2 กรัม ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมกรดย่อยปริมาตร 15 มิลลิลิตร วางทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ย่อยตัวอย่างบนถาดย่อยที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนควันสีน้ำตาลหมดไป ให้ปรับอุณหภูมิเป็น 190 องศาเซลเซียส จนได้สารละลายใส วางทิ้งให้เย็น เจือจางสารที่ได้จากการย่อยด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน เทใส่ volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้ใช้ในการวิเคราะห์ฟอสฟอรัส และ โปแตสเซียม

การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัส โดยวิธี Vanodomolybdate โดยปิเปตสารละลาย Vanadomolybdate ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง กับกราฟสารละลายมาตรฐาน คำนวณปริมาณฟอสฟอรัสในตัวอย่างพืชโดยสูตร

ฟอสฟอรัส (%) = (X - B) x V x 100/1,000 x W

X =ความเข้มข้นของ P ในตัวอย่างพืชเมื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (มิลลิกรัม/ลิตร)

B =ความเข้มข้นของ P ใน blank เมื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (มิลลิลิตร)

V =ปริมาตรของตัวอย่างที่ปรับปริมาตรหลังการย่อย (25 หรือ 50 มิลลิกรัม)

W =น้ำหนักตัวอย่างพืชที่นำมาวิเคราะห์ (มิลลิกรัม)

การวิเคราะห์ปริมาณโพแตสเซียม (K) โดยปิเปตสารละลายตัวอย่างพืชที่ได้มาจากการย่อย 10 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น นำไปวัดการปลดปล่อยแสง (emission) ด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer หาความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างเปรียบเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐาน คำนวณปริมาณโพแตสเซียมในตัวอย่างพืชโดยสูตร

โพแตสเซียม (ppm) = X x V x 1,000/W

X =ความเข้มข้นของธาตุที่อ่านได้เมื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

V =ปริมาตรสารละลายตัวอย่างเมื่อปรับปริมาตรหลังการย่อย

W =น้ำหนักตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ (มิลลิกรัม)