

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

1. วัสดุ

- 1.1 ต้นลองกอง ณ แปลงภาควิชาพืชศาสตร์ อายุ 10 ปี จำนวน 12 ต้น
- 1.2 ต้นลองกองในกระถาง อายุ 4 ปี จำนวน 15 ต้น
- 1.3 ป้ายแสดงหน่วยทดลองและเชื้อ
- 1.4 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
- 1.5 ถังกระดาษอบตัวอย่าง
- 1.6 ถุงซิปล
- 1.7 พลาสติก
- 1.8 สารกำจัดศัตรูพืช
- 1.9 ปุ๋ย
 - 1.9.1 ปุ๋ยคอก
 - 1.9.2 ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15
 - 1.9.3 ปุ๋ยใบสูตร 16-12-0
 - 1.9.4 ปุ๋ยใบสูตร 15-30-15
- 1.10 สารเคมี
 - 1.10.1 ไดเมทิลซัลไฟด์ (dimethyl sulfoxide; DMSO)
 - 1.10.2 กรดซาลิไซลิก (salicylic acid)
 - 1.10.3 กรดซัลฟิวริก (sulfuric acid)
 - 1.10.4 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide)
 - 1.10.5 เมทิลเรด (methyl red)
 - 1.10.6 โบรโมครีซอลกรีน (bromocresol green)

- 1.10.7 เอทานอล (ethanol)
- 1.10.8 กรดบอริก (boric acid)
- 1.10.9 โซเดียมไทโอซัลเฟต (sodium thiosulphate)
- 1.10.10 โพแทสเซียมซัลเฟต (potassium sulfate)
- 1.10.11 คอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulfate)
- 1.10.12 ซีลีเนียม (selenium)

2. อุปกรณ์

- 2.1 เครื่องวัดปริมาณไนโตรเจนและคลอโรฟิลล์ (Chlorophyll Meter, SPAD-502 Minolta Co., Ltd., Japan)
- 2.2 เครื่องวัดการซึมน้ำการเปิดปากใบ (Porometer) รุ่น AP4 ของ Delta-T, UK.
- 2.3 เครื่องวัดศักย์ของน้ำในใบ (Pressure Chamber) ของ PMS, U.S.A.
- 2.4 เครื่องวัดปริมาณความเข้มแสง (Light Meter) ใช้ Quantum sensor รุ่น Li-190SA ต่อกับ Li-250 Light meter ของ Licor, Inc., USA
- 2.5 เครื่องวัดความชื้นในดิน (Theta Probe) ใช้ (Data Logger) รุ่น TLOG2 ของ Delta-T, UK
- 2.6 เครื่องวัดอุณหภูมิและความชื้นอากาศ (HoBo Pro Series RH Temp.)
- 2.7 เครื่องวัดค่าการส่องผ่านของแสง (Spectrophotometer)
- 2.8 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
- 2.9 เครื่องกลั่นไนโตรเจน (Nitrogen distillation apparatus)
- 2.10 เครื่องปั่น (Blender)
- 2.11 เตาย่อยตัวอย่าง (Digestion block)
- 2.12 หลอดย่อยตัวอย่าง (Kjeldahl tube)
- 2.13 เครื่องชั่ง

- 2.14 ตู้อบ
- 2.15 ผ้าใยสังเคราะห์
- 2.16 อุปกรณ์เครื่องแก้ว
- 2.17 อุปกรณ์ถ่ายภาพ

3. วิธีการ

3.1 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไนโตรเจนและคลอโรฟิลล์จากการวิเคราะห์กับค่าที่อ่านได้จากคลอโรฟิลล์มิเตอร์ในแต่ละเดือน

3.1.1 สภาพอากาศระหว่างการทดลอง

บันทึกข้อมูลอุณหภูมิตามวิทยาระหว่างการทดลองตั้งแต่เดือนมกราคมถึงเดือนธันวาคม 2546 ประกอบด้วย ปริมาณน้ำฝน ค่าการระเหยน้ำ และอุณหภูมิสูงสุด-ต่ำสุด จากสถานีอากาศเกษตรคองหงส์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ซึ่งอยู่ห่างจากสถานที่ทำการทดลองประมาณ 1 กิโลเมตร

3.1.2 การเตรียมและการดูแลรักษาต้นลองกอง

การให้ปุ๋ย ใส่ปุ๋ยเม็ดสูตร 15-15-15 อัตรา 25 กิโลกรัมต่อต้น และปุ๋ยคอกอัตรา 10 กิโลกรัมต่อต้น เพื่อบำรุงต้น พันธุ์ใบสุตร 16-12-0 อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร จำนวน 2 ครั้ง ห่างกัน 10 เพื่อบำรุงต้นและกระตุ้นการแตกใบพันธุ์ใบสุตร 15-30-15 อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร จำนวน 2 ครั้ง ห่างกัน 10 เพื่อกระตุ้นการออกดอก การให้น้ำ งดน้ำในช่วงเดือนมกราคมและกุมภาพันธ์เพื่อกระตุ้นการออกดอก ในช่วงอื่นให้น้ำทุกวันโดยระบบสปริงเกอร์

ใช้ใบที่สมบูรณ์และมีการขยายของแผ่นใบเต็มที่ (fully expanding leaf) จากต้นลองกองอายุ 10 ปี จำนวน 12 ต้น ที่ปลูก ณ บริเวณแปลงภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ออตอ หาดใหญ่ จังหวัดสงขลา โดยทำการศึกษาข้อมูลเดือนละหนึ่งครั้งเป็นระยะเวลา 8 เดือน ตั้งแต่เดือน พฤษภาคม ถึง ธันวาคม พ.ศ. 2546 โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 2 การศึกษาย่อย ดังนี้

3.1.3 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไนโตรเจนจากการวิเคราะห์กับค่าที่อ่านได้จากคลอโรฟิลล์มิเตอร์ โดยมีวิธีการดังนี้

สุ่มเลือกใบลองกองที่สมบูรณ์และมีการขยายของแผ่นใบเต็มที่ ทำความสะอาด ทำการวัดด้วยคลอโรฟิลล์มิเตอร์ โดยหนีบแผ่นใบให้ระยะวัดอยู่ห่างจากเส้นกลางใบ ๆ ละ 6 จุด เพื่อหาค่าเฉลี่ย โดยใช้ใบลองกองจำนวน 30 ตัวอย่างต่อเดือน แต่เนื่องจากการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในใบพืชต้องใช้ใบพืช 10 ใบต่อหนึ่งตัวอย่าง ดังนั้นต้องใช้ใบที่วัดด้วยคลอโรฟิลล์มิเตอร์จำนวน 300 ใบต่อเดือน จากนั้นเก็บใบที่วัดค่าด้วยคลอโรฟิลล์มิเตอร์แล้ว ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง บดใบตัวอย่างแห้งให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น (blender) เก็บใบที่บดละเอียดแล้วไว้ในถุงซิปล เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของไนโตรเจนด้วยวิธีการของเคลดคาล (จำ เป็น, 2545) จากนั้นนำปริมาณไนโตรเจนที่ได้จากการวิเคราะห์ กับค่าที่อ่านได้จากคลอโรฟิลล์ มิเตอร์ มาหาสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; R^2) ระหว่างค่าทั้งสองของแต่ละเดือน และวิเคราะห์ความแตกต่างของความชันของสมการเชิงเส้นตรงแต่ละเดือนโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้วิเคราะห์สถิติ SPSS จากนั้น นำปริมาณไนโตรเจนจากการวิเคราะห์ของทุกเดือนมาหาสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและค่า สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์กับค่าที่อ่านได้จากคลอโรฟิลล์มิเตอร์

3.1.4 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคลอโรฟิลล์จากการวิเคราะห์กับค่าที่อ่านได้จากคลอโรฟิลล์มิเตอร์ มีวิธีการดังนี้

สุ่มเลือกใบลองกองที่สมบูรณ์และมีการขยายแผ่นใบเต็มที่ ทำความสะอาด ทำการวัดด้วยคลอโรฟิลล์มิเตอร์ โดยหนีบแผ่นใบๆ ละ 6 จุดเพื่อหาค่าเฉลี่ย ใช้จำนวนตัวอย่าง 50 ตัวอย่าง ต่อเดือน ตัวอย่างละ 1 ใบ เก็บใบที่วัดค่าด้วยคลอโรฟิลล์มิเตอร์ นำไปสกัดคลอโรฟิลล์ ด้วยสารไดเมททิลซัลโฟไซด์ ซึ่งมีวิธีการดังนี้

- ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ประมาณ 100 มิลลิกรัม (โดยหลีกเลี่ยงการใช้เนื้อเยื่อบริเวณเส้นใบและขอบใบ) แล้วใส่หลอดทดลอง
- เติมสาร DMSO ปริมาณ 7 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วนำไปอุ่นในอ่างปรับอุณหภูมิ ที่ควบคุมอุณหภูมิน้ำ 65 องศาเซลเซียส
- รอจนกระทั่งเนื้อเยื่อพืชเปลี่ยนจากสีเขียว เป็นสีขาวใส
- แยกส่วนของกากพืชออกจากสารละลาย โดยการกรองด้วยกระดาษกรอง

Whatman เบอร์ 1

- ปรับปริมาตรสารละลายที่กรองได้ด้วยสาร DMSO ให้เป็น 10 มิลลิลิตร
- นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์ โดยใช้วิธีวัดค่าการดูดซับแสงด้วยเครื่องวัดการส่องผ่านของแสง (spectrophotometer) ที่ช่วงคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร
- นำค่าที่อ่านได้ไปคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์รวม (วิรัตน์, 2541) คลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บี (Arnon, 1949) โดยใช้สมการ ดังนี้

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์รวม} = 20.2D_{645} + 8.02D_{663}$$

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ} = 12.7 D_{663} - 2.69 D_{645}$$

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์บี} = 22.9 D_{645} - 4.68 D_{663}$$

โดย ปริมาณคลอโรฟิลล์ที่ได้มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด

D_{645} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 645 นาโนเมตร

D_{663} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 663 นาโนเมตร

นำค่าที่อ่านได้จากคลอโรฟิลล์มิเตอร์และปริมาณคลอโรฟิลล์รวม คลอโรฟิลล์เอและคลอโรฟิลล์บีจากการวิเคราะห์ไปหาความสัมพันธ์ของสมการเชิงเส้นตรงและ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของแต่ละเดือน และวิเคราะห์ความแตกต่างของความชันของเส้นสมการความสัมพันธ์แต่ละเดือนโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้วิเคราะห์สถิติ SPSS จากนั้น นำปริมาณคลอโรฟิลล์ของทุกเดือนมาหาสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคลอโรฟิลล์รวม คลอโรฟิลล์เอและคลอโรฟิลล์บีจากการวิเคราะห์กับค่าที่อ่านได้จากคลอโรฟิลล์มิเตอร์

3.2 ศึกษาการใช้คลอโรฟิลล์มิเตอร์ประเมินปริมาณไนโตรเจนและคลอโรฟิลล์ในช่วงสถานะเครียดน้ำของตองกอง

ใช้ต้นตองกองอายุ 4 ปี จำนวน 15 ต้น มีเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นประมาณ 3 เซนติเมตร ขนาดทรงพุ่มใกล้เคียงกัน ที่ปลูกในกระถางเส้นผ่าศูนย์กลาง 20 นิ้ว บรรจุดิน 50 กิโลกรัม ตั้งอยู่ในโรงเรือนที่มีหลังคาเป็นพลาสติกใส ดูแลรักษาต้นโดยการใส่ปุ๋ยเม็ดสูตร 15-15-15 อัตรา 200 กรัมต่อต้นทุกๆ 2 เดือน และพ่นปุ๋ยใบสูตร 16-12-0 อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตรทุกๆ 3 เดือนทำการศึกษาเป็นระยะเวลา 14 วัน ในเดือนกรกฎาคม พ.ศ.2547 โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) มี 3 วิธีการทดลอง การทดลองละ 5 ซ้ำ ดังนี้

- วิธีการทดลองที่ 1 ให้น้ำทุกวัน
 วิธีการทดลองที่ 2 ให้น้ำ 1 ครั้งใน 7 วัน
 วิธีการทดลองที่ 3 งดการให้น้ำ

ศึกษาข้อมูล ดังนี้

3.2.1 การเปลี่ยนแปลงค่าคลอโรฟิลล์มิเตอร์ ทำการตัดป้ายเครื่องหมายที่ใบลองกอง โดยเลือกใบเพศลาของลองกองที่มีความสมบูรณ์ ต้นละ 2 ใบ ทำการวัดการเปลี่ยนแปลงค่าคลอโรฟิลล์มิเตอร์ วัดใบละ 6 ตำแหน่ง แล้วเฉลี่ยค่าของแต่ละใบ โดยพยายามให้ระยะวัดอยู่ห่างจากเส้นกลางใบและจุดที่วัดเป็นจุดเดิมทุกครั้ง วัดค่าอย่างต่อเนื่องวันเว้นวันในช่วงของการทดลอง นำค่าคลอโรฟิลล์มิเตอร์ที่ได้มาคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนและคลอโรฟิลล์รวม โดยใช้สมการความสัมพันธ์จากเดือนกรกฎาคมของการศึกษาที่ 3.1.3 และ 3.1.4 ตามลำดับ

3.2.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณไนโตรเจนและคลอโรฟิลล์จากการวิเคราะห์ ติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณไนโตรเจนและคลอโรฟิลล์จากการวิเคราะห์ โดยเก็บใบลองกองที่สมบูรณ์และมีการขยายแผ่นใบเต็มที่ ต้นละ 2 ตัวอย่าง เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนและคลอโรฟิลล์ โดยวิธีการของเคลคาลและสกัดด้วยสาร DMSO ตามลำดับ โดยทำการเก็บตัวอย่างใบในวันที่ 1 วันที่ 5 วันที่ 9 และวันที่ 14 ของการทดลอง

3.2.2 ปริมาณแสงเหนือทรงพุ่ม โดยใช้เครื่องวัดความเข้มแสง วัดความเข้มแสงภายในและภายนอกโรงเรือน ทุก 2 ชั่วโมง ตั้งแต่ 8.00 น.-16.00 น. ในวันที่ 1 วันที่ 7 และวันที่ 14 ของการทดลอง

3.2.3 สักข์ของน้ำในใบ โดยใช้เครื่องมือ Pressure chamber โดยเลือกใช้ใบเพศลาของพืช ต้นละ 2 ใบ ตัดใบแล้วใส่ในท่อความดันของเครื่องมือให้ก้านใบโผล่บริเวณลูกยางที่อุดฝาปิดท่อความดัน ให้แรงดันจากแก๊สไนโตรเจน สังเกตน้ำที่ถูกดันออกมาจากก้านใบแล้วบันทึกค่าทำการวัดสักข์ของน้ำในใบ ทุก 2 ชั่วโมง ตั้งแต่ 8.00 น.-16.00 น. ในวันที่ 1 วันที่ 7 และวันที่ 14 ของการทดลอง

3.2.3 ค่าการชักนำปากใบ โดยเครื่องวัดการชักนำปากใบพีช ก่อนทำการวัดปรับค่ามาตรฐานของเครื่องกับแผ่นปรับค่ามาตรฐาน ให้ค่าความผิดพลาดของเครื่องมือไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ ใช้ใบเพศลาตของพีช ทำความสะอาดแล้ววัดค่าการชักนำปากใบ ทุก 2 ชั่วโมง ในช่วง 8.00 น.-16.00 น. ในวันที่ 1 วันที่ 7 และวันที่ 14 ของการทดลอง

3.2.3 ความชื้นในดิน โดยเครื่องวัดความชื้นในดิน (Theta probe) ทำการฝังเครื่องวัดความชื้นในดินไว้ในกระถางของแต่ละวิธีการทดลอง และเก็บข้อมูลโดยใช้เครื่องบันทึกข้อมูล (Data Logger) ในช่วงเวลาที่ทำการทดลอง

3.2.3 วิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม Statistic Analysis System