บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. วัสดุ

1.1 วัสดุพืช

1.1.1 กิ่งพันธุ์ส้มจุกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางกิ่ง 0.25 - 0.30 เซนติเมตรและมีข้อใบ 5 - 6 ข้อ

1.1.2 ต้นตอส้ม 6 ชนิด คือ ส้มจุก (*Citrus recticulata* Blanco) ส้มจี๊ด (*Citrus japonica* Thumb.) ส้มโอ (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) มะกรูด (*Citrus hystrix* DC.) ส้มสามใบลูกผสมสายพันธุ์ทรอยเยอร์ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) และสายพันธุ์สวิงเกิล (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น 0.25 - 0.30 เซนติเมตร

1.2 วัสดุสารเคมี

1.2.1 สารเคมีตรวจสอบกายวิภาคของท่อลำเลียงด้วยวิธี SEM ประกอบด้วย พาลาเดียมผสมทองคำ แอลกอฮอล์ และ FAA

1.2.2 สารเคมีสกัดเอนไซม์ ประกอบด้วย Tris (hydroxymethyl) - methylamin HCl (Tris-HCl) 0.5 M (pH 8.6), Polyvinylpyrolidon (PVP), 2-mercapthoethanal และ Disodiumethylenediamine-tetracetate (Na_2EDTA)

1.2.3 สารเคมีอิเล็กโตรโฟริซีส ประกอบด้วย Polyacrylamide gel (30% acrylamide+0.8% bisacrylamide), Tris-HCl 1.5 M (pH 8.9) และ 0.5 M (pH 6.8), N,N,N_1,N_1-tetramethylendiamine (TEMED), 10% Ammonium peroxydisulphate (APS) และ Glycine

1.2.4 สารเคมีย้อมสีเอนไซม์ 8 ระบบ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สารเคมีย้อมสีเอนไซม์ 8 ระบบ

ระบบเอนไซม์	ส่วนประกอบ
เปอร์ออกซิเดส	3-amino-9-ethylcarbazole, β-napthol, Acetone, Tris-acetate buffer 0.0125 M (pH 4.0) และ H_2O_2 3%
เอสเตอเรส	Phosphate buffer 0.1 M (pH 6.0), Fast blue B salt และ α- napthyl acetate
ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส	Tris-HCl 0.1 M (pH 7.5), Fructose-6-P(Na), β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ($NADP^+$), Methylthiazolyldiphenyl tetrazolium bromide (MTT), N-methyl-phenazonium methyl sulfate (PMS), Glucose-6-phosphate dehydrogenase (glucose-6-P DH) และ Magnesium cholride ($MgCl_2.6H_2O$) 1M
ฟอสโฟกลูโคมิวเทส	Tris-HCl 0.1 M (pH 7.5), $MgCl_2.6H_2O$ 1 M, α D-glucose-1-phosphate (glucose-1-P), $NADP^+$, MTT, PMS และ Glucose-6-P DH
มาเลทดีไฮโดรจีเนส	Tris-HCl 0.1 M (pH 7.5), DL-malate 1 M (pH 7.5), β-nicotinamide adenine dinucleotide monohydrate (NAD^+), MTT และ PMS
แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส	Tris-HCl 0.1 M (pH 7.5), NAD^+, MTT, PMS, Ethanol
แอซิคฟอสฟาเทส	Na acetate 50 mM (pH 5.5), $MgCl_2.6H_2O$ 1 M, Fast black K salt และ α-napthyl acid phosphate
ชิกิเมทดีไฮโดรจีเนส	Tris-HCl 0.1 M (pH 7.5), Shikimic acid, $NADP^+$, MTT และ PMS

1.2.5 สารเคมีวิเคราะห์ธาตุอาหาร ประกอบด้วย กรดไฮโดรคลอริก กรดซัลโฟซาลิไซลิก กรดซัลฟูริก กรดไนตริก กรดเปอร์คลอริก แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ แอมโมเนียมเมทาวานาเดต แอมโมเนียมโมลิบเดต แอมโมเนียมฟอสโฟโมลิบเดต โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

1.3 วัสดุอื่น ประกอบด้วย กรรไกรตัดกิ่ง มีดเสียบยอด เทปใส เชือกฟาง ถุงเพาะกล้าขนาด 3 x 8 นิ้ว และขนาด 4 x 8 นิ้ว ถุงพลาสติกขนาด 9 x 14 นิ้ว เวอร์เนียร์ ไม้บรรทัด กระป๋องอบดิน ถุงอบตัวอย่างพืช น้ำดีไอออไนซ์ (Deionized distillationed water) ปากกาชนิดถาวร โกร่งบดตัวอย่างพืช

หลอดเอฟเพนดอร์ฟ หลอดทดลอง หลอดสำหรับย่อยตัวอย่าง หลอดกลั่น กระบอกตวง ขวดรูปกรวย ขวดปรับปริมาตร ไมโครปิเปต ถ้วยกระเบื้องทนไฟ กระจกนาฬิกา

2. อุปกรณ์

2.1 อุปกรณ์ตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา

2.1.1 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

2.2 อุปกรณ์ตรวจสอบทางสรีรวิทยา

2.2.1 เครื่องมือวัดศักย์ของน้ำในใบ

2.2.2 เครื่องชั่ง

2.3 อุปกรณ์ตรวจสอบทางชีวเคมี

2.3.1 เครื่องชั่ง ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.3.2 ตู้อบ

2.3.3 ตู้แช่แข็ง

2.3.4 เครื่องปั่นตกตะกอน

2.3.5 เครื่องอิเล็กโตรโฟริซีสแบบแนวตั้ง

2.3.6 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

2.3.7 เครื่องปั้มสูญญากาศ

2.3.8 เครื่องเขย่า

2.3.9 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส

2.3.10 เครื่องย่อยสลายตัวอย่างพืช

2.3.11 ตู้ดูดควัน

2.3.12 เตาไฟฟ้า

2.3.13 เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

2.3.14 เครื่องแฟลมอิมิชั่นสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

3. วิธีการ

3.1 เตรียมกิ่งพันธุ์ ต้นตอและการขยายพันธุ์

3.1.1 การเตรียมกิ่งพันธุ์ส้มจุกและต้นตอส้ม

กิ่งพันธุ์ส้มจุก นำมาจากต้นส้มจุกภาควิชาพืชศาสตร์ อายุ 3 ปี ที่มีการให้น้ำทุกวันๆ ละ 1 ครั้ง ให้ปุ๋ยสูตร 15 - 15 - 15 อัตรา 5 กรัมต่อต้นต่อเดือน และทำการฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดหนอนชอนใบ และเพลี้ยอ่อนในช่วงแตกใบอ่อน ส่วนต้นตอส้มเพาะเมล็ด 6 ชนิด คือ ส้มจุก ส้มจี๊ด ส้มโอ

มะกรูด (จากแปลงภาควิชาพืชศาสตร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา) ส้มสามใบลูกผสมสายพันธุ์ทรอยเยอร์และสายพันธุ์สวิงเกิล (จากสวนส้มธนาธร อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่) เลือกต้นกล้าที่แข็งแรง ลำต้นตรง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น 0.25 - 0.30 เซนติเมตร มาย้ายปลูกในถุงดำ ขนาด 3 x 8 นิ้ว ในดินผสม (ดินลำดวน : ทราย : แกลบ : ใยมะพร้าว อัตราส่วน 2 : 1 : 1 : 1) ดูแลรักษาในเรือนระแนงพรางแสง 30 เปอร์เซ็นต์ ให้น้ำวันละ 1 ครั้ง และให้ปุ๋ยสูตร 15 - 15 - 15 ต้นละ 250 มิลลิกรัมต่อต้นต่อเดือน เป็นเวลา 3 เดือนก่อนเสียบยอด ที่แปลงภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

3.1.2 การขยายพันธุ์

นำกิ่งพันธุ์ส้มจุก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น 0.25 - 0.30 เซนติเมตร มี 5 - 6 ตาใบ มาต่อกิ่งบนต้นตอส้ม 6 ชนิด (ในข้อ 3.1.1) ด้วยวิธีการเสียบยอดแบบเสียบลิ่ม เหนือผิวดิน 5 เซนติเมตร จากนั้นคลุมต้นด้วยถุงพลาสติก ขนาด 9 x 14 นิ้ว มัดปากถุงให้แน่นเพื่อควบคุมความชื้นภายใน ป้องกันลมและน้ำจากภายนอก แล้วนำไปวางเลี้ยงใต้ซาแลนที่พรางแสงแดดได้ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 เดือน นำถุงพลาสติกคลุมต้นออก ย้ายต้นไปไว้ใต้ซาแลนที่พรางแสงแดดได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนำต้นส้มไปไว้ใต้ซาแลนที่พรางแสงแดด 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ย้ายปลูกลงถุงปลูกใหม่ขนาด 4 x 8 นิ้ว เพื่อเพิ่มปริมาณธาตุอาหารและนำต้นไปดูแลภายใต้การให้แสงแดดปกติ นับจำนวนต้นรอดชีวิต และคำนวณความสำเร็จการต่อกิ่งหลังเสียบยอด 8 สัปดาห์ ตามสูตรดังนี้

$$\text{ความสำเร็จการต่อกิ่ง (\%)} = \frac{\text{จำนวนต้นที่ต่อกิ่งสำเร็จ}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \times 100$$

3.2 การศึกษาสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี

3.2.1 การศึกษาสัณฐานวิทยา แบ่งเป็น 3 การทดลอง ดังนี้

3.2.1.1 กายวิภาคศาสตร์ของลำต้นตัดขวางของต้นตอส้ม

ทำการศึกษากายวิภาคของต้นตอส้ม 6 ชนิด คือ ส้มจุก ส้มจี๊ด ส้มโอ มะกรูด ส้มสามใบลูกผสมสายพันธุ์ทรอยเยอร์และสายพันธุ์สวิงเกิล ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น 0.25 เซนติเมตร โดยตัดลำต้นสดตามขวาง ซึ่งต้องตัดให้บางและวางบนแผ่นสไลด์แล้วหยดสีย้อมอะซิโตคาร์มีน 2 เปอร์เซ็นต์ ปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ (cover slip) และนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 40 เท่า และวัดขนาดด้วย ocular microscopy แล้ววัดโครงสร้างลำต้นตัดขวางดังนี้ เพอริเดิร์ม วัดจากคอร์กถึงคอร์แคมเบียม (เซลล์ต่อกันและอัดตัวกันแน่นและสีเข้ม (อยู่นอกสุด) คอร์เทก วัดจากขอบล่างคอร์กแคมเบียมถึงเอนโดเดอร์มีส (เอนโดเดอร์มีสเป็นเซลล์แถวเดี่ยว) ท่อลำเลียงอาหาร วัดจากขอบล่างเอนโดเดอร์มีสถึงชั้นเนื้อเยื่อเจริญ (เนื้อเยื่อเจริญมี 2-3 แถว) ท่อลำเลียงน้ำ วัดจากขอบล่างเนื้อเยื่อเจริญถึงขอบแกนไม้ (ท่อลำเลียงน้ำมีการเรียงตัวของท่อต่อกันอย่างเป็นระเบียบและจะมีท่อเวสเซลขนาดต่างๆ

กันแทรกอยู่) และแกนไม้ (เป็นเซลล์ขนาดใหญ่และเกาะกันแบบหลวมๆ) ของลำต้นส้มแต่ละชนิด บันทึกขนาดรัศมีโครงสร้างของลำต้นส้มทั้ง 6 ชนิด

3.2.1.2 การประสานรอยต่อของต้นส้มจุกเสียบยอด

ตัดรอยต่อต้นส้มจุกที่ต่อกิ่งบนต้นตอส้ม 6 ชนิด อายุ 24 และ 48 สัปดาห์หลังเสียบยอด ตัดตามขวาง หนา 0.25 เซนติเมตร กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ตามวิธีการของเวคิน (2524) โดยตัดลำต้นตามขวาง หนา 0.20 เซนติเมตร ใส่ขวดดองและเติมน้ำยารักษาสภาพเซลล์ FAA ซึ่งประกอบด้วย Formalin : Acetic acid : Alcohol 50 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1 : 1 : 18 ส่วน แล้วนำไปดูดอากาศออกด้วยเครื่องปั๊มสูญญากาศ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อช่วยให้น้ำยารักษาสภาพเซลล์แทรกเข้าสู่เนื้อเยื่อได้ดีขึ้นเนื่องจากตัวอย่างพืชเป็นไม้เนื้อแข็ง และจะดองในน้ำยารักษาสภาพเซลล์เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นริน FAA ออก จากนั้นนำไปดึงน้ำออกนอกเซลล์ด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 70, 80, 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่ละความเข้มข้นแช่ไว้เวลา 30 นาที 2 ครั้ง จากนั้นทำแห้งด้วยเครื่อง Critical Point Drying (CPD) แล้วนำตัวอย่างพืชติดบนแท่นทองเหลือง (stub) แล้วฉาบด้วยโมเลกุลของโลหะ เช่น พาลาเดียมผสมทองคำ (Au-Pd) และนำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดดูการเจริญของรอยต่อ บันทึกภาพและเปรียบเทียบการเจริญของเนื้อเยื่อรอยต่อในแต่ละชนิดต้นตอ

3.2.1.3 การเจริญเติบโตของต้นส้มจุกเสียบยอด

ทำการศึกษาการเจริญเติบโตของต้นส้มจุกที่ต่อกิ่งบนต้นตอส้ม 6 ชนิด คือ ส้มจุก ส้มจี๊ด ส้มโอ มะกรูด ส้มสามใบลูกผสมสายพันธุ์ทรอยเยอร์และสายพันธุ์สวิงเกิล ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น 0.25 - 0.30 เซนติเมตร วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design : CRD) แต่ละชนิดต้นตอทำ 15 ซ้ำ วัดข้อมูลการเจริญเติบโต โดยเริ่มเก็บข้อมูลหลังเสียบยอด 8 สัปดาห์ จนถึง 48 สัปดาห์ วัดข้อมูลการเจริญเติบโตดังนี้ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นเหนือและใต้รอยต่อ (วัดห่างจากรอยต่อ 1 เซนติเมตร) จำนวนกิ่ง (นับกิ่งที่แตกใหม่และมีใบแล้ว) จำนวนใบ (นับใบที่แตกใหม่สามารถสังเคราะห์แสงได้) ความสูง (วัดจากขอบบนของรอยต่อถึงปลายทรงพุ่ม) พื้นที่ใบและความยาวรากวัดผลสัปดาห์ที่ 48 หลังเสียบยอด ด้วยเครื่องวัดพื้นที่ใบและเครื่องวัดความยาวราก น้ำหนักสดต้น (ลำต้น+ใบ) และราก น้ำหนักแห้งต้นและราก (อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง) และหาสัดส่วนน้ำหนักแห้งต้นต่อราก

3.2.2 การศึกษาสรีรวิทยา แบ่งเป็น 2 การทดลอง ดังนี้

3.2.2.1 การใช้น้ำในรอบวันของต้นส้มจุกเสียบยอด

ทำการศึกษาการใช้น้ำในรอบวันของต้นส้มจุกที่ต่อกิ่งบนต้นตอส้ม 6 ชนิด คือ ส้มจุก ส้มจี๊ด ส้มโอ มะกรูด ส้มสามใบลูกผสมสายพันธุ์ทรอยเยอร์และสายพันธุ์สวิงเกิล โดยชั่งน้ำหนักต้น (ชั่งน้ำหนักรวมต้นและถุงปลูก) หลังการให้น้ำที่ระดับความจุความชื้นชลประทาน (Field capacity)

60 เปอร์เซ็นต์ 24 ชั่วโมง บันทึกข้อมูล คำนวณปริมาณน้ำที่หายไปและนำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ (การศึกษานี้ไม่ได้นำค่าคายระเหยน้ำมาคำนวณเนื่องจากทุกหน่วยทดลองอยู่ในสภาพแวดล้อมเดียวกันและปริมาณน้ำที่ใช้ไปมีปริมาณน้อย) ก่อนให้น้ำต้องลดช่องว่างระหว่างดิน ด้วยการให้น้ำต้นส้มจุกที่ระดับดินอิ่มตัวด้วยน้ำ แล้วตั้งทิ้งไว้ 2 วัน (ระดับความชื้นดินเดิม) (Devlin and Witharn, 1983) แต่ละชนิดต้นตอทำ 4 ซ้ำ (ต้น) แบ่งศึกษาการใช้น้ำในรอบวันเป็น 5 ช่วง คือ ก่อนเสียบยอด หลังเสียบยอด 8, 16, 24 และ 48 สัปดาห์ แต่ละช่วงศึกษาทำ 5 ซ้ำ (วัน)

การหาความจุความชื้นดิน (วัลลภ, 2538) ทำโดยเก็บตัวอย่างดินผสมที่ผสมเสร็จแล้ว มาตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วนำดินใส่กระป๋องอบดิน ชั่งน้ำหนักดินสด และนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักดินแห้ง คำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้น ดังสูตร

$$\text{ความชื้นดิน (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักดินชื้น} - \text{น้ำหนักดินแห้ง}}{\text{น้ำหนักดินแห้ง}} \times 100$$

จากนั้นหาความจุความชื้นชลประทาน โดยการนำดินปลูกที่ผสมแล้วใส่ภาชนะทรงกระบอกปลายเปิดสูง 8 เซนติเมตร ใส่น้ำจนซึมออกมาด้านล่าง ปิดปากภาชนะด้านบนป้องกันการระเหย ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นตักดินส่วนกลางมาใส่กระป๋องอบดิน ชั่งน้ำหนักดินสด แล้วนำดินไปอบแห้งเช่นเดียวกับการหาความชื้นดินข้างต้น คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นและคำนวณปริมาณการให้น้ำต้นส้มจุกที่ระดับ 60 เปอร์เซ็นต์ของความจุความชื้นชลประทาน (ภาคผนวก)

3.2.2.2 ศักย์ของน้ำในใบของต้นส้มจุกเสียบยอด

ทำการศึกษาค่าศักย์ของน้ำในใบของต้นส้มจุกที่ต่อกิ่งบนต้นตอส้ม 6 ชนิด คือ ส้มจุก ส้มจี๊ด ส้มโอ มะกรูด ส้มสามใบลูกผสมสายพันธุ์ทรอยเยอร์และสายพันธุ์สวิงเกิล วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด หน่วยทดลองละ 3 ซ้ำ (ใบ) และแบ่งศึกษาเป็น 5 ช่วง คือ ก่อนเสียบยอด หลังเสียบยอด 8, 16, 24 และ 48 สัปดาห์ ทำการวัดค่าศักย์ของน้ำในใบด้วยเครื่องมือวัดศักย์ของน้ำในใบ โดยเลือกตัดใบเพสลาดหรือใบอ่อนที่แผ่นใบแผ่เต็มที่แล้ว จากนั้นนำก้านใบมาใส่ในท่อความดัน ปิดฝาครอบและสังเกตน้ำในใบที่ถูกดันด้วยแก๊สไนโตรเจน และบันทึกค่าแรงดันแก๊สที่น้ำโผล่ออกมาครั้งแรก วัดเวลา 12.00 นาฬิกา เปรียบเทียบค่าที่ได้ในแต่ละหน่วยทดลอง

3.2.3 การศึกษาชีวเคมี แบ่งเป็น 2 การทดลอง

3.2.3.1 รูปแบบไอโซไซม์ของต้นส้มจุกเสียบยอด

ทำการศึกษารูปแบบไอโซไซม์จากแถบเอนไซม์เหนือรอยต่อและใต้รอยต่อของต้นส้มจุกที่ต่อกิ่งบนต้นตอส้ม 6 ชนิด คือ ส้มจุก ส้มจี๊ด ส้มโอ มะกรูด ส้มสามใบลูกผสมสายพันธุ์ทรอยเยอร์และสายพันธุ์สวิงเกิล โดยการสกัดเอนไซม์จากเปลือกลำต้นส่วนเหนือและใต้รอยต่อกว้าง 0.30 x 0.30 เซนติเมตร มาบดร่วมกับสารละลายบัพเฟอร์ (โกร่งเย็น) ซึ่งประกอบด้วย Tris-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ (pH 7.5), PVP เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์, 2-mercapthoethanol เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/

ปริมาตร), Na_2EDTA เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 30 เท่าของน้ำหนักพืช จากนั้นเทตัวอย่างพืชที่บดละเอียดใส่หลอดเอฟเพนดอร์ฟ นำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส (มาลี, 2541) จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดเอฟเพนดอร์ฟใหม่ แล้วนำไปแยกเอนไซม์ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟริซีสแบบแนวตั้ง ด้วยการดูดสารละลายพืชที่สกัดได้ 15 ไมโครลิตร ผสมกับ bromphenol blue 2 ไมโครลิตร ใส่ในร่องหวีแผ่นเจลอะคริลาไมด์ชนิดไม่ต่อเนื่องโดยเจล อะคริลาไมด์ ประกอบด้วย เจลส่วนบนที่มีความเข้มข้น 3% และเจลส่วนล่างที่มีความ เข้มข้น 10% ภายใต้กระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ (Hame and Rickwood, 1981 อ้างโดย สมปอง และคณะ, 2538) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือสังเกตจากแถบ bromphenol blue เคลื่อนมาถึงขอบล่างเจล จากนั้นนำเจลมาย้อมสีเอนไซม์ด้วยระบบเปอร์ออกซิเดส เอสเตอเรส ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส ฟอสโฟกลูโคมิวเทส มาเลทดีไฮโดรจีเนส แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส แอซิดฟอสฟาเทส และชิคิเมทดีไฮโดรจีเนส โดยนำไปเขย่าที่เครื่องเขย่า 80 ครั้งต่อนาที รอจนเห็นแถบเอนไซม์ชัดเจนหรือแถบสีคงที่ไม่เปลี่ยนแปลง นำมาล้างสีด้วยน้ำกลั่น 2 - 3 ครั้ง ตรวจสอบรูปแบบไอโซไซม์ของกิ่งพันธุ์ส้มจุกและต้นตอส้มแต่ละชนิด บันทึกภาพเปรียบเทียบการเกิดแถบเอนไซม์แต่ละหน่วยทดลอง

3.2.3.2 ปริมาณธาตุอาหารของต้นส้มจุกเสียบยอด

ทำการศึกษาธาตุอาหารในใบส้มจุกที่ต่อกิ่งบนต้นส้ม 6 ชนิด คือ ส้มจุก ส้มจี๊ด ส้มโอ มะกรูด ส้มสามใบลูกผสมสายพันธุ์ทรอยเยอร์และสายพันธุ์สวิงเกิล อายุ 48 สัปดาห์หลังเสียบยอด ชนิดละ 3 ซ้ำ ชนิดละ 20 ใบ มาอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นบดละเอียดด้วยโกร่ง แล้วนำไปวิเคราะห์ธาตุอาหาร ดังนี้

3.2.3.2.1 วิเคราะห์ธาตุไนโตรเจน โดยวิธี Kjeldahl (ดัดแปลงจาก Cottenie, 1980) ด้วยการนำตัวอย่างใบส้มที่บดละเอียด 0.20 กรัม มาย่อยด้วยกรดย่อย (กรดซัลโฟซาลิไซลิก 25 เปอร์เซ็นต์ ในกรดซัลฟูริก) 5 มิลลิลิตร พร้อมกับเตรียมสารเปรียบเทียบ คือใส่เฉพาะสารย่อยแต่ไม่ต้องใส่ตัวอย่างใบส้ม จากนั้นกลั่นหาปริมาณแอมโมเนียม ด้วยการเติมกรดบอริก 4 เปอร์เซ็นต์ 25 มิลลิลิตร ในขวดรูปกรวย ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปวางใต้ก้านหลอดกลั่น เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร และเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 เปอร์เซ็นต์ 75 มิลลิลิตร ในหลอดกลั่น เปิดเครื่องกลั่น เป็นเวลา 4 นาที ปิดเครื่องกลั่น นำสารออกจากหลอดกลั่น จากนั้นนำมาไทเตรตด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.02 นอร์มอล จนสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงแดง บันทึกปริมาตรกรดที่ใช้ไทเตรตและคำนวณหาปริมาณรวมไนโตรเจน ดังสูตร

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (\%)} = \frac{14 \times N \times V \times 100}{W}$$

N = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (กรดซัลฟูริก) หน่วยเป็นนอร์มอล

V = ปริมาตรสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้ไทเตรต (ลบจากปริมาตรกรดที่ใช้ไทเตรตตัวอย่างเปรียบเทียบ) หน่วยเป็นมิลลิลิตร

W = น้ำหนักตัวอย่างใบส้ม หน่วยเป็นมิลลิกรัม

3.2.3.2.2 วิเคราะห์ธาตุฟอสฟอรัส โดย Colorimetry (ดัดแปลงจาก Cottenie, 1980) ด้วยการนำตัวอย่างใบส้มที่บดละเอียด 0.20 กรัม มาย่อยด้วยกรดผสม (กรดไนตริก 1250 มิลลิลิตร ผสมกับกรดเปอร์คลอริก 250 มิลลิลิตรและแอมโมเนียมเมทาวานาเดต 0.6 กรัม) 15 มิลลิลิตร อย่างน้อย 2 ชั่วโมง จากนั้นให้ความร้อนโดยวางบนแผ่นให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จะเห็นควันสีน้ำตาล และเมื่อควันหมด ปรับอุณหภูมิเป็น 190 องศาเซลเซียส ได้ควันสีขาวและเมื่อมีการย่อยสิ้นสุดจะเกิดควันสีขาวในขวด และรอจนสารละลายใส วางให้เย็นแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร จากนั้นดูดตัวอย่างสารละลาย 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายวานาโดโมลิบเดต 5 มิลลิลิตร เขย่า (สารละลายสีเหลือง) วางทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง และนำมาวัดความเข้มสีด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (กราฟระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสง) (รูปภาคผนวกที่ 1) และคำนวณหาปริมาณฟอสฟอรัส ดังสูตร

$$\text{ปริมาณฟอสฟอรัส (\%)} = \frac{C \times Vf \times Vd \times 10^{-4}}{W \times Va}$$

C = ความเข้มข้นฟอสฟอรัสจากกราฟมาตรฐาน หน่วยเป็น พีพีเอ็ม

Vf = ปริมาตรสุดท้าย (15 มิลลิลิตร)

Vd= ปริมาตรสารละลายตัวอย่างพืชที่ได้จากการย่อย (100 มิลลิลิตร)

Va= ปริมาตรสารละลายตัวอย่างพืชที่ใช้ในการวิเคราะห์ (5 มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักตัวอย่างใบส้ม หน่วยเป็นกรัม

3.2.3.2.3วิเคราะห์ธาตุโพแทสเซียม โดย Flame emission spectrophotometry (ดัดแปลงจาก Cottenie, 1980) ด้วยการนำตัวอย่างใบส้มที่บดละเอียด 0.20 กรัม มาย่อยด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการย่อยหาธาตุปริมาณฟอสฟอรัสในข้อ 3.2.3.2.2 ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายที่ได้มาวัดค่าเปล่งแสงด้วยเครื่องแฟลมอิมิสชั่นสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 766.5 นาโนเมตร นำค่าเปล่งแสงที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปภาคผนวกที่ 2) และคำนวณหาปริมาณโพแทสเซียม ดังสูตร

$$\text{ปริมาณโพแทสเซียม (\%)} = \frac{(Cs-Cb) \times Vd \times 10^{-4}}{W}$$

Cs = ความเข้มข้นของโพแทสเซียมในสารละลายตัวอย่างพืชจากกราฟมาตรฐาน หน่วยเป็น พีพีเอ็ม

Cb = ความเข้มข้นของโพแทสเซียมในตัวอย่างเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐาน หน่วยเป็น พีพีเอ็ม

Vd = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างพืชที่ได้จากการย่อยสลาย (100 มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักวอย่างใบส้ม หน่วยเป็นกรัม