บทที่ 3
อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

<u>การทดลองที่ 1</u> การใช้แบบแผนไอโซไซม์ในการทดสอบสายพันธุ์ปอสาที่ใช้ในการทดลอง

ทำการศึกษา isozyme pattern โดยวิธีทางอิเล็กโทรโฟรีซีส ตามวิธีการของ เพิ่ม พงษ์ (2531)

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 ตัวอย่างพืช โดยใช้ใบปอสาสด ช่วงใบที่ 6-8 จากยอดลงมา เมื่อพืชอายุ 8 สัปดาห์

1.2 สารเคมี

1.2.1 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ extraction buffer มีดังนี้

- Phosphate buffer 0.1 M pH 7.5
- Polyvinyl-polypyrrolidone (PVP) 5%

1.2.2 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของเจล มีดังนี้

- Acrylamide stock solution (acrylamide 28 กรัมและ bis-acrylamide 0.74 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาณ 100 มิลลิกรัม เก็บไว้ในขวดสีชาที่ 4 ° เซลเซียส)
- Tris-chloride buffer pH 8.9 (กรองและเก็บไว้ในขวดสีชา)
- Tris-chloride buffer pH 6.7 (กรองและเก็บไว้ในขวดสีชา)
- Ammonium persulfate (APS) เตรียมทันทีก่อนใช้

1.2.3 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ marker dye solution

- Glycerol
- Tris-chloride buffer pH 6.7
- Bromophenol blue

1.2.4 สารเคมีที่ใช้เป็น electrode buffer

- Tris
- Glycine
- NaOH
- น้ำกลั่น

1.2.5 สารเคมีที่ใช้ย้อมเอนไซม์

- Phosphate buffer 0.1 M pH 6.0
- Fast blue B Salt
- α - naphthyl acetate
- Absolute alcohol
- 3-amino-9-ethylcarbozole
- β - naphthol
- Acetone
- Tris buffer 0.1 M pH 4.0
- Tris - (hydroxymethy) aminomethane
- Acetic acid
- Hydrogenperoxide 3% (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

1.3 เครื่องทำความเย็น ตู้เย็นและตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 ° เซลเซียส

1.4 เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบชนิดแผ่น (slab)

1.5 เครื่องหมุนเหวี่ยงสารชนิดควบคุมความเย็นได้ (refrigerated centrifuge)

1.6 เครื่องกวนสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer)

1.7 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

1.8 โกร่งบดตัวอย่าง

1.9 หลอดใส่สารขนาดเล็ก (eppendrof tube) ขนาด 5 มิลลิลิตร

1.10 หลอดใส่สารปรับปริมาตรได้ (syringe)

1.11 Micropipette ชนิดปรับปริมาตรได้ model pipeman

1.12 เครื่อง degasser

1.13 เครื่องชั่ง

1.14 อุปกรณ์อื่นๆ เช่น ถุงมือ ปากคีบ กระดาษชั่งสาร ช้อนตักสาร กระดาษติดป้าย แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ กล้องถ่ายรูป ฟิล์มถ่ายรูป ฯลฯ

2. วิธีการศึกษา และบันทึกข้อมูล

ทำการศึกษา isozyme pattern โดยวิธีทางอิเล็กโทรโฟรีซีส ตามวิธีการของ เพิ่ม พงษ์ (2531) ดังนี้

2.1 การเตรียมชิ้นส่วนพืช

นำใบสดมาตัดเส้นใบ โดยเลือกใบที่สะอาดไม่เป็นโรค เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -20° เซลเซียส

2.2 การเตรียม stock และสารละลาย

2.2.1 Electrode buffer

Solution A Tris buffer pH 8.3 (x 10)

Tris	6.0	g
Glycine	28.8	g
H_2O ปรับปริมาตร	1,000	ml

ปรับ pH เป็น 8.3 โดย NaOH

<u>หมายเหตุ</u> Tris คือ Trizma base หรือ Tris (hydroxymethyl) aminomethane

2.2.2 Gel buffer

Solution B Tris-chloride buffer pH 8.9

HCl 1 N	48.00	ml
Tris	36.60	g
TEMED	0.23	ml
H_2O ปรับปริมาตร	100	ml

กรองและเก็บในที่มืด

Solution C Tris-chloride buffer pH 6.7

HCl 1 N	48.00	ml
Tris	5.98	g
TEMED	0.46	ml
H_2O ปรับปริมาตร	100	ml

กรองและเก็บในที่มืด

<u>หมายเหตุ</u> TEMED คือ N,N,N′,N′,-tetramethyl ethylendiamine

Solution D Acrylamide stock

Acrylamide	28.00	g
N,N′ - methylene bisacrylamide	0.74	g
H_2O ปรับปริมาตร	100	ml

กรองและเก็บในที่มืด

Solution $(NH_4)_2S_2O_8$ (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

2.2.3 Marker dye solution

Bromophenolblue	0.05	g
Solution C	10.00	ml
Glycerol	1.00	ml

เวลาผสม marker dye solution จะใช้เพียง 10% เท่านั้น

2.2.4 Extraction buffer

Phosphate buffer 0.1 M pH 7.5

Stock A : 0.1 M monobasic potassium phosphate (KH_2PO_4)(13.60 g./1000 ml)

Stock B : 0.1 M dibasic potassium phosphate (K_2HPO_4)(17.90 g./1000 ml)

Stock C : stock A 16.00 ml + stock B 84.00 ml เติมน้ำให้ครบ 200 ml ปรับ pH 7.5

เวลาจะใช้ phosphate buffer 0.1 M pH 7.5 บดตัวอย่างพืช จะใช้ stock C 50.00 ml เติมน้ำให้ครบ 100 ml แล้วปรับ pH ให้ได้ 7.5

2.2.5 การเตรียมสารละลายเพื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ Peroxidase (PER)

Stock A :	3-amino-9-ethylcarbazole	0.42	g
	β-naphthol	0.29	g
	Acetone	200.00	ml
	กรองในที่มืด		
Stock B :	Tris buffer 0.1 M pH 4.0		
	tris-(hydroxymethyl) aminomethane	1.89	g
	acetic acid	2.025	ml
	H_2O adjust	1,250	ml
	เก็บในที่มืดและเย็น		
Stock C:	Hydrogenperoxide 3%		
	H_2O_2 30%	10	ml
	H_2O adjust	100	ml
	เตรียมใหม่ทุกครั้ง		

ใช้ในอัตราส่วนระหว่าง stock A : stock B : stock C = 20:80:1

2.3 การเตรียมเจลความเข้มข้น 8.5%

Running gel

- Solution B	7.50	ml
- Solution D	18.21	ml
- Solution $(NH_4)_2S_2O_8$	300.00	µl
- น้ำกลั่น	34.29	ml

ผสมให้เข้ากันใส่ลงในระหว่างแผ่นแก้วที่ประกบรอไว้ตามด้วยน้ำกลั่น ทิ้ง polymerize ไว้ 60-90 นาที

Stracking gel

- Solution C	2.50	ml
- Solution D	2.00	ml
- Solution $(NH_4)_2S_2O_8$	300.00	µl
- น้ำกลั่น	15.20	ml

ผสมให้เข้ากันใส่ลงด้านบนของ running gel แล้วเสียบหวีลงไป รอให้ polymerize 60 นาที

2.4 การสกัดเอนไซม์

2.4.1 นำส่วนของใบที่ 6-7 จากปลายยอดลงมา ทำการตัดเส้นใบออกแล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปสกัดโดยใช้ตัวอย่าง 1.0 กรัม ต่อสารละลาย phosphate buffer 0.1 M pH 7.5 ปริมาณ 3 มิลลิลิตร + 5% polyvinyl-pyrrolidone (PVP) ปริมาณ 0.3 กรัม บดในโกร่งที่อุณหภูมิประมาณ 4° เซลเซียส โดยบดให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วกรองผ่านผ้าขาวบาง 1 ชั้น

2.4.2 นำตัวอย่างที่สกัดได้จากข้อ 3.1 ไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 18,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4° เซลเซียส แล้วแยกสารละลายใสด้าน บนที่ได้ใส่ขวด Vial ที่สะอาด เก็บในตู้แช่ -20° เซลเซียส เพื่อนำไปทำ polyacrylamide gel electrophoresis

2.5 การเตรียม slab gel

2.5.1 ต่อชุดแผ่นแก้วสำหรับทำ slab gel ใช้ spacer เป็นตัวปรับความหนาของเจลตามความต้องการ (0.75-1.00 มิลลิเมตร) คำนวนปริมาณของเจลที่จะใช้โดยใส่ stracking gel (upper gel) เหนือ separating gel (lower gel)

2.5.2 เทสารละลายของเจล 8.5% ที่ยังไม่ได้ polymerize ใส่ลงระหว่างแผ่นแก้วที่เตรียมไว้ให้สูง 12.5 เซ็นติเมตร จากนั้นค่อยๆ หนดน้ำกลั่นให้คลุมผิว เจล ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง เมื่อเจลแข็งตัวจะเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำที่คลุมผิวเจลได้ชัดเจน

2.5.3 ค่อยๆ ล้างส่วนของ separating gel สอด comb ลงใน gel plate ระวังอย่าให้มีฟองอากาศเกิดในช่องของหวี ทิ้วไว้ให้เจลแข็งตัวใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

2.5.4 ดึงหวีออกจาก stracking gel หยอดน้ำกลั่นลงในช่องซึ่งเกิดขึ้นหลังจากดึงหวีออก เพื่อล้างช่องนั้น หลังจากนั้นดูดน้ำกลั่นออกจนเห็นช่องว่างเหล่านั้นชัดเจน

2.6. การทำอิเล็กโทรโฟรีซีส

2.6.1 ต่อชุดอิเล็กโทรโฟรีซีสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม electrode buffer ลงใน chamber

2.6.2 ใส่ตัวอย่างเอนไซม์ที่ผสม marker dye solution ลงในช่องบน stracking gel โดยใช้เข็มสำหรับ loading ค่อยๆ หยอดผ่าน buffer ลงในช่องเจล

2.6.3 ต่อขั้วบวกกับ chamber ล่าง และขั้วลบเข้ากับ chamber บน แล้วเปิดสวิตช์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยใช้กระแสที่ 200 โวลท์ โดยควบคุมอุณหภูมิขณะจ่ายกระแสไฟฟ้า ให้มีอุณหภูมิ 4-7 ° เซลเซียส

2.6.4 เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า เมื่อเวลาผ่านไป 3-4 ชั่วโมง สีของ bromophenol blue จะเคลื่อนที่มาถึงปลายล่างของเจล

2.6.5 นำแผ่นแก้วออกจาก chamber และนำแผ่นเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นแก้วออกมาวางบน plate เพื่อย้อมเอนไซม์ต่อไป

2.7 การย้อมสีเอนไซม์ในเจล

เตรียม staining solution ของไอโซไซม์ เทลงบน plate ที่มีเจลอยู่ นำไปเก็บในที่มืดในอุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที จนปรากฏแถบสี จากนั้น หยุดปฏิกิริยาด้วยการล้างน้ำไหลช้าๆ เป็นเวลานานๆ เพื่อล้างสีของตะกอนส่วนที่เกินที่เกิดระหว่างปฏิกิริยา จนแผ่นเจลมีพื้นเจลใสหรือเห็นแถบสีได้ชัดเจน

2.8 การบันทึกข้อมูล

นำเจลที่ย้อมสีแล้วมาศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ จากตำแหน่ง จำนวนและขนาด โดย

- นำแผ่นเจลที่ย้อมสีแล้ว มานับจำนวนแถบสีที่ปรากฏบนแผ่นเจล แล้วจดบันทึกจำนวนแถบสีที่นับได้ของปอสาแต่ละสายพันธุ์

- ใช้ไม้บรรทัดวัดความหนาของแถบสีแต่ละแถบว่ามีความหนาเท่าไหร่แล้วทำการจดบันทึกข้อมูลเก็บไว้ จากนั้นใช้ไม้บรรทัดวัดระยะการเคลื่อนที่ของแถบสีแต่ละแถบโดยวัดจากขอบของแผ่นเจลเข้ามาถึงจุดกึ่งกลางของแถบสีที่ทำการวัดขณะนั้น ได้ระยะทางเท่าไหร่ก็จดบันทึกข้อมูลไว้ จากนั้นจึงวัดแถบสีอันต่อไปจนครบทั้งหมด

- วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบสี bromophenol blue ที่ปรากฏให้เห็นบนแผ่นเจลเพื่อที่จะได้นำไปใช้ในการคำนวณหาค่า Rf ต่อไป

- นำค่าระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบสีแต่ละแถบและระยะทางการเคลื่อนที่ของ bromophenol blue มาคำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพันธ์ (Rf) ตามสมการต่อไปนี้

$$\text{ค่าการเคลื่อนที่สัมพันธ์ (Rf)} = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบสี}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบสี bromophenol blue}}$$

<u>การทดลองที่ 2</u> การศึกษาผลของความชื้นในดินที่มีต่อการเจริญเติบโต และคุณภาพเส้นใยของสายพันธุ์ปอสา

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1. พืชทดลอง สายพันธุ์ปอสา 9 สายพันธุ์ คือ

1.1.1 CMPMC 92017 (ใช้เป็นพันธุ์แม่) = V1

1.1.2 CMPMC 92018 (ใช้เป็นพันธุ์แม่) = V2

1.1.3 CMPMC 94011 (ใช้เป็นพันธุ์พ่อ) = V3

1.1.4 CMPMC 94005 (ใช้เป็นพันธุ์พ่อ) = V4

1.1.5 CMPMC 94019 (ใช้เป็นพันธุ์พ่อ) = V5

1.1.6 ลูกผสมชั่วที่ 1 CMPMC 92017/CMPMC 94011 = V6 (V1/ V3)

1.1.7 ลูกผสมชั่วที่ 1 CMPMC 92018/CMPMC 94011 = V7 (V2/V3)

1.1.8 ลูกผสมชั่วที่ 1 CMPMC 92018/CMPMC 94005 = V8 (V2/V4)

1.1.9 ลูกผสมชั่วที่ 1 CMPMC 92018/CMPMC 94019 = V9 (V2/V5)

1.2. เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

1.2.1 บ่อคอนกรีตขนาด กว้าง 1.20 เมตร ยาว 4.00 เมตร สูง 1.00 เมตร

1.2.2 เวอร์เนียแคลลิเปิร์ส

1.2.3 Tensiometer

1.2.4 เครื่องชั่งไฟฟ้า

1.2.5 ตู้อบ

1.2.6 เส้นใยปอสาแห้ง ที่ผ่านการตีเยื่อแล้ว

1.2.7 Micrometer

1.2.8 กล้องจุลทรรศน์

1.2.9 บีกเกอร์

1.2.10 สไลด์ และ cover glass

1.2.11 เข็มเขี่ย

1.2.12 Forcep

1.2.13 Dropper

1.2.14 น้ำกลั่น

1.2.15 โกร่งบดตัวอย่างพืช

1.2.16 เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

1.2.17 เครื่องชั่งไฟฟ้า

1.2.18 อะซิโตน 80%

1.2.19 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

1.2.20 กระบอกตวง

1.2.21 กรวยกรอง

1.2.22 อื่นๆ เช่น มีด กระดาษทิชชู แท่งแก้ว ขวดพลาสติกขนาดเล็ก

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

2. การวางแผนการทดลอง

จัดสิ่งทดลองแบบ Factorial โดยใช้แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 x 9 สิ่งทดลองดังนี้

ปัจจัยที่ 1 ระดับน้ำในดิน 4 ระดับ คือ

ระดับที่ 1 ความชื้นในดิน 100 % F.C.

ระดับที่ 2 ความชื้นในดิน 75 % F.C.

ระดับที่ 3 ความชื้นในดิน 50 % F.C.

ระดับที่ 4 ความชื้นในดิน 25 % F.C.

ปัจจัยที่ 2 สายพันธุ์ปอสาไทยจำนวน 9 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ปอสาไทย พันธุ์ลูกผสม 4 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ปอสาไทยที่ได้จากการคัดเลือกจำนวน 5 สายพันธุ์

โดยในแต่ละกรรมวิธีทดลอง 5 ซ้ำ

3. การเตรียมสายพันธุ์ และการปลูกทดลอง

ทำการเตรียมกล้า โดยวิธีปักชำหรือเพาะเมล็ดในถุงพลาสติก เมื่ออายุ 60 วัน ย้ายปลูกทดลองในสภาพบ่อคอนกรีตที่สามารถควบคุมความชื้นได้ โดยในแต่ละระดับความชื้นปลูกสายพันธุ์หรือคู่ผสมละ 1 แถว แถวละ 5 ต้น แต่ละต้น คือ 1 ซ้ำ ใช้ระยะปลูก 20 x 40 เซนติเมตร ในสภาพบ่อคอนกรีตขนาดกว้าง 1.20 เมตร ยาว 4.00 เมตร และสูง 1.00 เมตร ใส่ปุ๋ยหมักอัตรา 2,000 กิโลกรัมต่อไร่ เก็บเกี่ยวเมื่อปอสาอายุ 3 เดือนหลังปลูก

4 การให้น้ำ

ให้น้ำในปริมาณความชื้น 4 ระดับ ตามกรรมวิธี วัดความชื้นของดินด้วยเครื่อง Tensiometer และมีการรดน้ำปรับความชื้นให้สม่ำเสมอทุก 2-3 วัน ซึ่งการให้น้ำจะทำการให้จนมีระดับความชื้นในดินถึงระดับที่กำหนดไว้ในแต่ละกรรมวิธีดังนี้

- ทำการทดสอบการให้น้ำในแต่ละระดับความชื้นโดยเริ่มจากความชื้นที่ 100 %FC เป็นอันดับแรก โดยหาค่าแปอรเซ็นต์ความชื้นโดยน้ำหนักของดินที่ 100 %FC โดยทำการให้

น้ำในบ่อคอนกรีตที่ใช้ในการทดลอง ให้จนกระทั่งน้ำหยุดซึมลงสู่ดินแต่จะไหลไปตามผิวดิน ซึ่งในสภาพนี้เป็นสภาพที่ดินได้รับน้ำอย่างเต็มที่แล้วจนน้ำไม่สามารถซึมลงสู่ชั้นดินได้อีก

- หลังจากให้น้ำ 1 วัน ทำการเก็บตัวอย่างดินเพื่อนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นโดยน้ำหนัก โดยเก็บตัวอย่างดินที่ความลึกประมาณ 15 เซนติเมตร นำไปชั่งแล้วอบให้แห้งที่อุณหภูมิประมาณ 100-120 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 48 ชั่วโมง แล้วนำดินที่อบแห้งไปชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำมาคำนวณหาความชื้นในดินดังสมการ (เฉลิมพล, 2535)

$$G\ (\%) = \frac{\text{น้ำหนักดินก่อนอบ} - \text{น้ำหนักดินหลังอบ}}{\text{น้ำหนักดินหลังอบ}} \times 100$$

G = Gravimetrig Soin Moisture Content

ซึ่งเปอร์เซ็นต์ความชื้นที่คำนวณได้เป็นความชื้นที่ 100 %FC ต้องนำไปเทียบหาเปอร์เซ็นต์ความชื่นที่ 25, 50 และ 75 %FC ต่อไป

- ช่วงที่เจาะตัวอย่างดิน ทำการวัดความชื้นในดินด้วยเครื่อง Tensiometer (หน่วย : pf) ไปด้วยพร้อมกัน โดยจุดที่ทำการวัดความชื้นเป็นจุดเดียวกันกับที่เก็บตัวอย่างดินมาอบ เพื่อจะได้นำค่าทั้งสองมาหาค่ารีเกรสชั่น (regression) เพื่อเช็คถึงความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าที่วัดได้จากเครื่อง Tensiometer กับเปอร์เซ็นต์ความชื้นโดยน้ำหนัก ในภายหลัง

- นำข้อมูลเปอร์เซ็นต์ความชื้นโดยน้ำหนัก กับค่าที่วัดได้จากเครื่อง Tensiometer ครั้งแรกนี้มาคำนวณหาสมการรีเกรสชั่น เพื่อใช้เป็นแนวทางเบื้องต้นในการปรับการให้น้ำในกรรมวิธีอื่นๆ

- ทำการให้น้ำในทุกกรรมวิธีโดยใช้สมการรีเกรสชั่นที่ได้คำนวณหาปริมาณน้ำที่จะต้องให้ในแต่ละกรรมวิธีในแต่ละครั้ง โดยหลังจากให้น้ำ 1 วัน ทำการวัดความชื้นในดินด้วย Tensiometer และทำการเจาะดินเพื่อนำไปหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นต่อไป โดยคราวนี้ปฏิบัติเหมือนกันในทุกระดับความชื้น เพื่อนำค่าที่ได้มาหาสมการรีเกรสชั่นต่อไป จนกว่าค่าของสมการรีเกรสชั่นที่ได้จะคงที่หรือใกล้เคียงกันมากที่สุดในระดับที่ยอมรับได้ ซึ่งค่าของสมการรีเกรสชั่นที่คำนวณได้เริ่มใกล้เคียงกันมากขึ้นเรื่อยๆ ในการทดสอบการให้น้ำแต่ละครั้ง ซึ่ง

เป็นการแสดงให้เห็นว่าการควบคุมระดับของความชื้นเริ่มมีประสิทธิภาพมากขึ้นและถูกต้องแม่นยำมากขึ้น

- ทำการทดสอบซ้ำตามวิธีเดิมทุกๆ 3 วัน ติดต่อกัน 1 เดือนก่อนปลูก และทดสอบต่อไปอีก 1 เดือนนับจากวันปลูก รวมเป็นระยะเวลา 2 เดือน ในการวัดหาค่าความคงที่ของการให้น้ำในแต่ละกรรมวิธี โดยแต่ละครั้งวัดปริมาณน้ำที่ให้ด้วยทุกครั้ง ซึ่งปริมาณการให้น้ำแต่ละครั้ง ในแต่ละกรรมวิธีสรุปได้ตามตารางที่ 1

- ช่วงที่เริ่มทำการเก็บของมูลการทดลอง (1 เดือนหลังปลูก) จะทำการวัดค่าความชื้นในดินด้วยเครื่อง Tensiometer เพียงอย่างเดียวโดยไม่เจาะตัวอย่างดินเหมือนทุกครั้ง เพื่อป้องกันผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นได้กับระบบราก ซึ่งการวัดด้วยเครื่อง Tensiometer ทุกครั้งจะใช้ข้อมูลที่ทำการทดสอบก่อนหน้านี้เป็นตัวเช็ค ซึ่งผลของข้อมูลที่ทดสอบได้ในการให้น้ำแต่ละกรรมวิธี ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 24-27

ตารางที่ 1 ปริมาณการให้น้ำปอสาแต่ละครั้ง ในแต่ละกรรมวิธี (ลิตร)

ระดับความชื้นในดิน (%FC)	ปริมาณน้ำที่ให้ (ลิตร)
25	60
50	120
75	180
100	240

5. วิธีการศึกษาและบันทึกข้อมูล

ดำเนินการทดลองที่เรือนเพาะปลูกของศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างเดือน มีนาคม พ.ศ. 2538 ถึง กรกฎาคม พ.ศ. 2538 โดยทำการบันทึกข้อมูลดังนี้

5.1 การเจริญเติบโตของต้นปอสา

5.1.1 ความสูงของต้น วัดความสูงจากพื้นดินถึงส่วนยอด มีหน่วยเป็นเซนติเมตร ทำการวัดทุกสัปดาห์ จนถึงระยะเก็บเกี่ยว

5.1.2 เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น วัดส่วนของลำต้นในแนวระดับที่สูงจากพื้นดินขึ้นมา 5 เซนติเมตร แล้วทำเครื่องหมายเพื่อใช้ในการวัดครั้งต่อไป โดยใช้เวอร์เนียแคลลิเปิร์ส เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นมีหน่วยเป็นเซนติเมตร

ข้อมูลความสูงของต้น และเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น แต่ละครั้งที่วัดได้นำมาเฉลี่ยเป็นข้อมูลแต่ระดับ ทำการบันทึกสัปดาห์ละครั้ง จำนวน 9 ครั้ง นำมาหาอัตราการเจริญเติบโตตามสูตรที่แนะนำโดย พาวิน (2535) และรายงานตามสูตรของ Shabana *et al.* (1981) คือ

$$R = \frac{(Xt - Xo) \times 100}{Xo}$$

โดย R = อัตราการเติบโต เป็นร้อยละ

Xt = ค่าการวัดครั้งหลัง

Xo = ค่าการวัดครั้งแรก

5.2 ผลผลิต

5.2.1 ต้นสด โดยการชั่งน้ำหนักทั้งต้นก่อนทำการลอกเปลือก

5.2.2 เปลือกใน เปลือกนอก และแก่น เป็นผลผลิตซึ่งแยกจากลำต้นปอสา ชั่งน้ำหนักแยกเป็นสามส่วน คือ เปลือกใน เปลือกนอก และแก่น โดยชั่งน้ำหนักหลังจากลอกและตากแห้งไว้ 7 วัน

5.3 คุณภาพผลผลิต

5.3.1 คุณภาพเส้นใย ทำการตรวจคุณภาพเยื่อ ซึ่งผ่านขบวนการเตรียมเยื่อตามกรรมวิธีของ เพิ่มศักดิ์และคณะ (2538) โดยกำหนดให้ คะแนน สีของเยื่อ 3 ระดับคือ

1 = สีขาว

2 = สีขาวขุ่น

3 = สีน้ำตาลอ่อน

5.3.2 ปริมาณเปอร์เซ็นต์เยื่อแห้งที่เหลือจากขบวนการต้มเยื่อ

โดยนำเปลือกในปอสาแต่ละสายพันธุ์และความชื้นจำนวน 3 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 10 กรัม นำไปผ่านขบวนการเตรียมเยื่อโดยการต้มกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักปอ ต้มนาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปผ่านขบวนการฟอกขาว โดยใช้ผงคลอรีนโซเดียมไฮโปคลอไรท์ เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักปอ

แช่นาน 5 ชั่วโมง หลังจากผ่านขบวนการต้มหรือฟอกต้องล้างน้ำให้สะอาด นำเปลือกปอที่ผ่านขบวนการฟอกแล้วไปตีเยื่อด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้นาน 3 นาที นำเยื่อที่ได้อบแห้งที่อุณหภูมิ 70 ° เซลเซียส นาน 3 วัน ชั่งน้ำหนักแห้งของเยื่อแห้งที่เหลือ

5.3.3 ความกว้างความยาวของเส้นใย โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

5.3.3.1 การเตรียมสไลด์

- นำเส้นใยปอสาใส่ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นพอประมาณ แล้วใช้แท่งแก้วคนให้เส้นใยแตกตัว
- ใช้ forcep คีบเส้นใยเพียงเล็กน้อย นำมาวางลงบนแผ่นสไลด์ หยดน้ำตามลงไป1-2 หยด แล้วปิดด้วย cover glass จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเคาะเบาๆ บน cover glass เพื่อให้เส้นใยกระจายตัว

5.3.3.2 การวัดเส้นใย

นำแผ่นสไลด์ที่เตรียมได้จากข้อ 1 ไปส่องวัดความยาวและความกว้างของเส้นใยด้วยกล้องจุลทัศน์ที่ติดตั้ง Ocular micrometer เรียบร้อยแล้ว โดย

- การวัดความยาวของเส้นใย ใช้กำลังขยายเลนส์ตา 10 เท่า เลนส์วัตถุ 4 เท่า
- การวัดความกว้างของเส้นใย ใช้กำลังขยายเลนส์ตา 10 เท่า เลนส์วัตถุ 40 เท่า

5.3.3.3 การบันทึกข้อมูล

- การวัดความยาวของเส้นใย วัดกรรมวิธีละ 5 ต้น ต้นละ 10 ซ้ำ
- การวัดความกว้างของเส้นใย วัดกรรมวิธีละ 5 ต้น ต้นละ 10 ซ้ำ

5.4 ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บีในใบ

5.4.1. การเตรียมตัวอย่างพืช

เก็บใบปอสาสด ช่วงใบที่ 6-8 ของแต่ละสายพันธุ์ และในแต่ละระดับความชื้น โดยเลือกใบที่สมบูรณ์ปราศจากโรคและแมลงรบกวน แล้วนำมาสกัดหาปริมาณคลอโรฟิลล์ให้เสร็จสิ้นภายในวันเดียวกัน

5.4.2 วิธีการศึกษาและบันทึกข้อมูล

วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์จากใบปอสา ตามวิธีการวิเคราะห์คลอโรฟิลล์ของ Witham *et al.* (1971) ดังนี้

นำใบปอสามาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ คลุกเคล้าให้เข้ากัน นำไปบดให้ละเอียด แล้วสุ่มตัวอย่างมา 1 กรัม เติมอะซิโตน 80% ปริมาณ 10 มิลลิลิตร นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 1) บนกระบอกตวง พร้อมทั้งล้างเศษที่ติดอยู่ในโกร่งบดด้วยอะซิโตน 80% 2-3 ครั้ง จนไม่มีรงควัตถุสีเขียวติดอยู่กับกาก และปรับปริมาตรครั้งสุดท้ายโดยการเติมอะซิโตน 80% ให้ครบ 20 มิลลิลิตรพอดี และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ช่วงคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร โดยใช้อะซิโตน 80% เป็น Blank นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ โดยมีหน่วยเป็น มิลลิกรัมของคลอโรฟิลล์ต่อกรัมน้ำหนักใบแห้ง ตามสูตรคือ

คลอโรฟิลล์เอ = (12.7 D663 - 2.69 D645) V/1000 x W

คลอโรฟิลล์บี = (22.9 D645 - 4.68 D663) V/1000 x W

D = ค่าการดูดกลืนแสง

V = ปริมาตรของสารละลายรงควัตถุ (20 มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักของใบ (1 กรัม)

5.5 การวัดความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ (Relative Humidity)

โดยการใช้ Assman's Psychrometer ในการวัด วิธีการ คือ แขวน Assman's Psychrometer ในแนวระดับ สูงประมาณ 1.0 เมตร จากพื้น จากนั้นอ่านค่าของอุณหภูมิกระเปาะทั้งสองมาเทียบกับตารางมาตรฐาน (Aspiration Psychrometer's Table) ก็จะทราบค่าความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศในขณะนั้น มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ (%)

5.6 การวัดอุณหภูมิเฉลี่ยในโรงเรือน

ใช้เทอร์โมมิเตอร์ในการวัด โดยทำการวัด 3 ช่วง ใน 1 วัน คือ ช่วงเช้า กลางวัน และเย็น แล้วนำค่าที่วัดได้มาหาอุณหภูมิเฉลี่ยในวันนั้น

นำข้อมูลการเจริญเติบโตของปอสาในด้านต่างๆ ที่บันทึกได้ตลอดการทดลอง ไปวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติ โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูล Sirichai Version 5.0

สถานที่ดำเนินการทดลอง

1. เรื่อนปลูกพืชทดลอง ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการชีวเคมี ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม

ระยะเวลาดำเนินการทดลอง

ตั้งแต่ กุมภาพันธ์ 2538 ถึง กุมภาพันธ์ 2540