

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. วัสดุพันธุ์พืช

ต้นมะนาวพันธุ์เป็น อายุ 1 ปี จำนวน 30 ต้นมาจากสวนคุณสุรเทพ เทพลิขิตกุล บ้านเลขที่ 89 หมู่ 3 ตำบลยางเนิ้ง อำเภอสารภี จังหวัดเชียงใหม่

ปลูกในกระถางดินเผาขนาดความจุ 50 ลิตร ใช้ทรายละเอียดเป็นวัสดุปลูก ทำการปลูก ณ แปลงทดลองไม้ผล ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แปลงปลูกมะนาว

2. อุปกรณ์

2.1 ตลับเมตร

2.2 เวอร์เนียร์คาร์ลิปเปอร์

2.3 เครื่องนับแบบใช้มือ (counter)

2.4 เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (hand refractometer) ของบริษัท

ATAGO รุ่น N1 อ่านค่าตั้งแต่ 0-32 องศาบริกซ์ ($^{\circ}$ brix)

2.5 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ของบริษัท Beckman รุ่น PHTM 40

2.6 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ของบริษัท Beckman รุ่น

DU7500

2.7 เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius รุ่น BA3100P

และแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius รุ่น BP110S

2.8 ตู้อบ

2.9 ตู้เย็น

2.10 โกร่งบด

2.11 กระดาษกรอง Whatman No.1

2.12 มีดปอกผลไม้

2.13 ถังเก็บตัวอย่างพืช

2.14 ป้ายชื่อพร้อมปากกาเคมี

2.15 กล้องถ่ายรูป

2.16 เครื่องแก้ว

2.16.1 บีกเกอร์

2.16.2 Erlenmeyer flask

2.16.3 Volumetric flask

2.16.4 กระจกตวง

2.16.5 บิวเรต

2.16.6 ปีเปต

2.16.7 Dropper

2.16.8 กรวยกรอง

2.16.9 หลอดทดลอง

2.17 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide Merck) เข้มข้น 0.1 N เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

3. วิธีการทดลอง

3.1 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design ; CRD) จำนวน 10 ซ้ำๆ ละ 1 ต้น มี 3 กรรมวิธี คือ

ศึกษาผลของความเข้มข้นของไนโตรเจน 3 ระดับ คือ

กรรมวิธีที่ 1 ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน 600 meq/l

กรรมวิธีที่ 2 ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน 800 meq/l

กรรมวิธีที่ 3 ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน 1000 meq/l

ทุกกรรมวิธีให้ธาตุอาหารรองตามคำแนะนำของ Hoagland and Arnon (1952) ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 6.5

เริ่มทำการทดลองในแปลงปลูกตั้งแต่เดือนธันวาคม 2541 และสิ้นสุดการทดลองเดือนธันวาคม 2542

3.2 การให้ธาตุอาหารกับต้นมะนาว

ให้ธาตุอาหารพืชในรูปสารละลายทุกวันๆ ละประมาณ 1-2 ลิตรต่อต้นตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง โดยรดให้กับต้นมะนาวในช่วงเช้า (9.00 น. -10.00 น.) ตามแผนการทดลอง และล้างเกลือที่สะสมในวัสดุปลูกด้วยน้ำเปล่าทุกๆ 30 วัน โดยการให้น้ำไหลผ่านวัสดุปลูกเป็นเวลา 10-15 นาที

4. การบันทึกข้อมูล

4.1 การวัดการเจริญเติบโตทางกิ่งใบ

บันทึกผลข้อมูลการเจริญเติบโตเดือนละ 2 ครั้ง จำนวน 6 เดือน เริ่มตั้งแต่เดือน ธันวาคม 2541 – พฤษภาคม 2542 แล้วนำมาหาอัตราการเจริญเติบโตในแต่ละกรรมวิธีตามสูตรรายงานโดย Shabana *et al.*(1981)

$$R = \frac{(X_t - X_o) \times 100}{X_o}$$

โดยที่

R = อัตราการเจริญเติบโตเป็นร้อยละ

X_t = ค่าการวัดครั้งหลัง

X_o = ค่าการวัดครั้งแรก

4.1.1 ขนาดความสูงของต้น

โดยใช้ตลับเมตรวัดความสูงจากจุดที่กำหนด (ขอบกระถาง)

ถึงส่วนที่สูงที่สุดของต้น ใช้หน่วยเป็นเซนติเมตร

4.1.2 ขนาดของทรงพุ่ม

โดยใช้ตลับเมตร วัดจากปลายใบของทรงพุ่มส่วนที่กว้างที่สุดของสองแนว คือ ในแนวทิศตะวันออก - ตะวันตก และแนวทิศเหนือ - ใต้ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยของทั้งสองแนว ใช้หน่วยเป็นเซนติเมตร

4.1.3 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น

วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง โดยใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์ วัดตรงจุดกำหนดบริเวณโคนต้นเหนือขอบกระถางประมาณ 5 เซนติเมตร ทำเครื่องหมายเพื่อทำการวัดครั้งต่อไป ใช้หน่วยเป็นเซนติเมตร

4.2 การวัดการเจริญเติบโตของช่อใบ ช่อดอก ช่อผล และผล

4.2.1 จำนวนช่อใบที่ผลิออกมาในแต่ละเดือน

โดยการนับจำนวนช่อใบที่ผลิออกมาใหม่ที่มีขนาดความยาว 5-10 เซนติเมตร หรือมีใบจริง 4-5 ใบ (ภาพที่ 2)

4.2.2 จำนวนช่อดอกต่อต้นในแต่ละเดือน

โดยการนับจำนวนช่อดอกตูมที่เปลี่ยนเป็นสีขาวก่อนดอกบาน ที่มีขนาด 2-3 มิลลิเมตร (ภาพที่ 3)

4.2.3 จำนวนช่อผลต่อต้นในแต่ละเดือน

โดยการนับช่อผลที่มีขนาดผลประมาณ 5 มิลลิเมตรขึ้นไป (ภาพที่ 4)

4.2.4 เปอร์เซ็นต์การติดผลในแต่ละต้น

โดยการคำนวณจาก เปอร์เซ็นต์การติดผล = $\frac{\text{จำนวนข้อผลทั้งหมด} \times 100}{\text{จำนวนข้อดอก}}$



ภาพที่ 2 การแตกข้อใบของมะนาว



ภาพที่ 3 การออกดอกของมะนาว

4.2.4 วัดการเจริญเติบโตของผล

เมื่อมีการติดผลแล้วจึงทำการสุ่มวัดขนาดผลด้วยเวอร์เนียสคาลิเปอร์ วัดความกว้าง คือส่วนที่กว้างที่สุดของผล และความสูง คือส่วนระหว่างรอยต่อของขั้วผลจนถึงปลายก้นของผล แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย มีหน่วยเป็นเซนติเมตร (ทัศนุพันธุ์, 2532)



ภาพที่ 4 การติดผลของมะนาว

4.3 การวัดคุณภาพของผลผลิต

โดยการเริ่มวัดตั้งแต่ผลมะนาวเริ่มมีน้ำหรืออายุประมาณ 4 เดือน และวัดทุกๆ 15 วันจนกว่าผลจะสุก โดยการตรวจสอบลักษณะทั้งภายนอกและภายใน ตรวจสอบคุณภาพผลมะนาวจาก 3 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำๆละ 5 ผล ดังนี้

4.3.1 ขนาดผล

โดยใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์ วัดความกว้าง คือส่วนที่กว้างที่สุดของผล และความสูง คือส่วนระหว่างรอยต่อของขั้วผลจนถึงปลายกันของผล แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย มีหน่วยเป็นเซนติเมตร (ทศนุพันธ์, 2532)

4.3.2 น้ำหนักผล

โดยใช้เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius แล้วบันทึกผลจากค่าที่อ่านได้ ใช้หน่วยเป็นกรัม

4.3.3 ปริมาณน้ำคั้น

โดยใช้กระบอกตวง 50 มิลลิลิตร บันทึกผลเป็นหน่วยมิลลิลิตร

4.3.4 ปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ (Titratable Acidity ; TA) ในรูปของ citric acid

นำน้ำคั้นที่ได้จากผลมะนาวมา 1 มล. ใสลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มล. เติมน้ำกลั่นลงไป 9 มล. เหย้าให้เข้ากัน นำไปไตเตรตกับโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 N ใช้ ฟีนอล์ฟทาลีนเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ ไตเตรตจนสารละลายในขวดรูปชมพู่เปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน วัดปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไตเตรต (ลักขณา และ นิธิยา, 2533) นำมาคำนวณหาปริมาณกรดโดยคำนวณจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์กรด} = \text{normality of NaOH} \times \text{equi.wt. of citric acid} \times \text{vol. NaOH} \times 100$$

4.3.5 ปริมาณรวมของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Total Soluble Solids ; TSS)

ทำการวัดโดยใช้เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (hand refractometer) ของบริษัท ATAGO รุ่น N1 (0-32 °brix) โดยการเอาน้ำคั้นที่ได้จากผลมะนาวหยดลงบนแผ่นปริซึมของเครื่อง hand refractometer แล้วส่องดูกับแสง จากนั้นบันทึกค่าที่อ่านได้ มีหน่วยเป็นองศาบริกซ์

4.3.6 ค่าความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำมะนาว

วัดค่าโดยใช้เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter) ของบริษัท Beckman รุ่น PH™ 40 อ่านค่าเป็นเลขทศนิยม 2 ตำแหน่ง

4.4 น้ำหนักแห้งของแต่ละส่วนเมื่อเสร็จสิ้นการทดลอง

โดยแยกหาน้ำหนักแห้งของแต่ละส่วนของต้นพืช คือ ใบ ลำต้น และราก โดยการนำมาอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (คณัช, 2533) แล้วนำมาหาล้วนส่วนระหว่างส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดิน

4.5 การวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และคลอโรฟิลล์ บี ในใบ

นำตัวอย่างใบพืชมาจำนวน 1 กรัม ทำความสะอาดแล้วนำมาบดให้ละเอียด แห้ด้วยอะซิโตนเข้มข้น 80 % ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 จนได้สารละลายเป็นสีเขียว วัดค่า absorbance ที่ช่วงคลื่น 663 และ 645 นาโนเมตร

ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ มีหน่วยเป็นมิลลิกรัม โดยใช้สูตรของ Whitham *et al.* (1971) ดังสมการ

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ (มก. / กรัม น้ำหนักสด)} = \frac{[12.7 (D_{663}) - 2.69 (D_{645})] \times V}{1000 \times W}$$

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์บี (มก. / กรัม น้ำหนักสด)} = \frac{[22.9 (D_{645}) - 4.68 (D_{663})] \times V}{1000 \times W}$$

โดย D = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นนั้นๆ

V = ปริมาตรของละลายคลอโรฟิลล์ที่ปรับปริมาตรแล้ว

W = น้ำหนักเป็นกรัมของใบมะนาวที่นำมาสกัดคลอโรฟิลล์

4.6 การวิเคราะห์หาปริมาณธาตุอาหารไนโบ

4.6.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

สุ่มเก็บตัวอย่างใบมะนาวตำแหน่งที่ 3 และ 4 ถัดจากใบยอด (Chapman, 1960) จำนวนชุดละ 30 ใบต่อดัน นำตัวอย่างมาล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (Grant and Mac Naughlain, 1968) แล้วนำมาเก็บไว้ใน dessicator ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงนำไปบดให้ละเอียด เก็บใส่ถุงพลาสติกก่อนนำไปชั่งเพื่อย่อยตัวอย่าง

ฟอสฟอรัส

ชั่งตัวอย่างพืชที่บดละเอียดแล้วหนัก 1.0000-1.0999 ก. บันทึกรับน้ำหนักพืชไว้ใช้เทคนิค 4 ตำแหน่ง นำตัวอย่างที่ชั่งใส่ volumetric flask 250 มล. ใส่สารที่เตรียมไว้ 20 มล. (HNO₃ conc. และ HClO₄ conc. ในอัตรา 3:1) ทิ้งไว้ 1 คืน นำมาย่อยใช้อุณหภูมิ 50, 100, 280 องศาเซลเซียสและเพิ่มขึ้นจนถึงอุณหภูมิสุดท้าย 320 องศาเซลเซียส ตัวอย่างจะมีสีเริ่มแรกจากอุณหภูมิต่ำ คือจะมีควันสีเหลืองเข้ม จนเริ่มเกิดควันสีขาว และตัวอย่างที่ได้จะเป็นสีขาวใส ยกเว้นทิ้งไว้ให้เย็น นำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำมาทำการปรับสีโดยวิธี Vanadate Method (Jackson, 1967)

ตัวอย่างที่ปรับสีแล้วทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำมาอ่านค่าด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่น 430 นาโนเมตร นำค่าที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของปริมาณ ฟอสฟอรัสที่ความเข้มข้น 0, 4, 12, 20 จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้น (%) โดยใช้ สูตรคำนวณ

$$\text{Total P(\%)} = (\text{Sample concentration (ppm)} - \text{Blank (ppm)}) \times \frac{25}{V} \times \frac{100}{W_s}$$

- เมื่อ
- Sample = ความเข้มข้นตัวอย่าง (ppm.)
 - Blank = ความเข้มข้นของตัวเปรียบเทียบ (ppm.)
 - W_s = น้ำหนักของตัวอย่างพืช (ก.)
 - V = ปริมาตรของตัวอย่างพืชที่ใช้ (มล.)
 - 25 = ปริมาตรสุดท้ายของตัวอย่าง (มล.)
 - 100 = ปริมาตรสุดท้ายของตัวอย่างที่ย่อยแล้ว (มล.)

ไนโตรเจน

นำตัวอย่างที่บดจากการหาปริมาณฟอสฟอรัสมาชั่งหนัก 0.5000 – 0.5099 ก. ใส่ใน volumetric flask เดิมสาร เดิมสารที่ใช้ย่อย N 10 มล. (H_2SO_4 conc. 1 ลิตร, K_2SO_4 100 กรัม และ Selenium (Se) 1 กรัม ผสมรวมกันตั้งบน hot plate ค่อยเพิ่มอุณหภูมิประมาณ 400° ซ จนสารย่อยเกิดสีขาวใส) จากนั้นนำไปย่อยในเครื่องย่อย (block digestion) จนเกิดสีขาวใสแล้วนำไปกลั่น (โดยใช้ boric acid เข้มข้น 4% ปริมาตร 25 มล. และใช้ NaOH เข้มข้น 40% ปริมาตร 100 มล. โดยเตรียมในเครื่องกลั่น) กลั่นด้วยเครื่อง Tecator Kjeltac system 100z จน boric acid 125 มล. นำไปไตเตรตด้วย HCl 0.1 N จนเกิดสีบานเย็น-ชมพู ได้สีเท่ากับสี Blank จึงหยุดไตเตรต บันทึกปริมาตรที่ใช้ของ HCl เข้มข้น 0.1 N โดยใช้สูตรคำนวณ

$$\text{Total N (\%)} = \frac{\text{ความเข้มข้น HCl ที่ไตเตรต} \times (\text{HCl ที่ไตเตรตได้} - \text{Blank (ppm.)}) \times 0.014 \times 100}{\text{น้ำหนัตัวอย่างพืช}}$$

น้ำหนัตัวอย่างพืช

โปแตสเซียม

นำตัวอย่างที่ได้จากการย่อยหาปริมาณฟอสฟอรัสที่อยู่ใน volumetric flask 100 มล. คูณมา 1 มล. ปรับด้วย 0.5 N 9 มล. นำไปปั่น ให้เนื้อสารเท่ากัน นำไปวัดด้วยเครื่อง Atomic absorption Spectrophotometer บันทึกค่าที่อ่านได้โดยใช้สูตรคำนวณ

$$\text{Total K (\%)} = \frac{\text{Sample concentration} - \text{Blank (ppm.)} \times 100 \times 10}{W_s}$$

- เมื่อ
- Sample = ความเข้มข้นตัวอย่าง (ppm.)
 - Blank = ความเข้มข้นของตัวเปรียบเทียบ (ppm.)
 - W_s = น้ำหนักของตัวอย่างพืช (ก.)
 - 100 = ปริมาตรสุดท้ายของตัวอย่างที่ใช้ (มล.)
 - 10 = จำนวนการ Dilution (ใช้ 10 เท่า)

แคลเซียมและแมกนีเซียม

ใช้ตัวอย่างจากหลอดทดลองของโปแตสเซียมที่เตรียมไว้มาละลายให้เจือจาง แล้วนำสารละลายดังกล่าวไปอ่านค่า Ca และ Mg ด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrophotometer โดยใช้สูตรคำนวณ

$$\text{Total Ca (\%)} = \frac{\text{Sample concentration} - \text{Blank (ppm.)} \times 100 \times 40}{W_s}$$

และ

$$\text{Total Mg (\%)} = \frac{\text{Sample concentration} - \text{Blank (ppm.)} \times 100 \times 40}{W_s}$$

- เมื่อ
- Sample = ความเข้มข้นตัวอย่าง (ppm.)
 - Blank = ความเข้มข้นของตัวเปรียบเทียบ (ppm.)
 - W_s = น้ำหนักของตัวอย่างพืช (ก.)
 - 100 = ปริมาตรสุดท้ายของตัวอย่างที่ใช้ (มล.)
 - 40 = จำนวนการ Dilution (ใช้ 40 เท่า)