บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 พืชทดลอง

ต้นลำไยพันธุ์ดอ (*Dimocarpus longan* cv. Daw) อายุ 8 ปี ณ แปลงทดลองไม้ผล สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืชและภูมิทัศน์ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตจันทบุรี โดยต้นลำไยที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้รับการตัดแต่งกิ่งและดูแลรักษาต้นเป็นอย่างดี

ภาพที่ 2 ลักษณะต้นลำไยพันธุ์ดอที่ใช้ในการทดลอง

3.2 อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1) Atomic absorption spectrophotometer (Perkin Elmer Ltd., 3100)
2) Compound Microscope (Olympus® BX51, Japan)
3) Freezing microtome (Leica® CM1850, Germany)
4) โกร่งบดตัวอย่าง และเครื่องปั่นแยกกาก (Mulinex®)
5) เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo®, Switzerland)
6) Spectrophotometer (Shimadzu® UV-1601, JAPAN)
7) pH-meter (Sartorius Professional Meter® PP-50, Taiwan)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8) Hot air oven (Memmert®, Germany)

9) เตาย่อยตัวอย่าง (MS Scientific Instrument®, Thailand)

10) Water bath (Memmert®, Germany)

3.2.2 เครื่องแก้ว และอุปกรณ์พื้นฐานในห้องปฏิบัติการ

3.2.3 สารเคมี

1) Ammonium dihydrogen phosphate ($NH_4H_2PO_4$)

2) Ammonium molybdate ($[(NH_4)]_6\ Mo_7O_{24} . 4H_2O$) (Merck®, 101182)

3) Ammonium nitrate (NH_4NO_3) (J.T.Baker®,6484-52-2)

4) Ammonium sulfate ($[NH_4]_2SO_4$) (Merck®, A897117.836)

5) Ammonium acetate (CH_3COONH_4) (Merck®, 1.01116.1000)

6) Antimony potassium tartrate ($KSbO.C_4H_4O_7$) (Fisher®, 28300-74-5)

7) Ascorbic acid ($C_6H_8O_6$) (Rankem®, A2847)

8) Benzoic acid (C_6H_5OCOOH)(Rankem®, B0108)

9) Copper (II) sulfate ($CuSO_4.5H_2O$) (Merck®, A501690)

10) Deionized distill water 1 M

11) D-Glucose anhydrous ($C_6H_{12}O_6$) (Ajax®, A783)

12) di-Potassium hydrogen orthophosphate (K_2HPO_4) (Rankem®, 0246)

13) di-Sodium hydrogen arsenate ($Na_2HAsO_2 \cdot 7H_2O$) (Sigma, S9663)

14) di-Sodium hydrogen phosphate ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) (Merck®, 106579)

15) di-Chloroethylliphosphonic acid (ethephon)

16) EDTA disodium salt . $2H_2O$ (Rankem®, E0122)

17) Ethanol absolute (Merck®, 100983)

18) Formaline 40% (Gamma®, 99-105)

19) Haematoxylin ($C_{16}H_{14}O_6$)

20) Hydrogen peroxide 30% (H_2O_2) (Merck®, B22287)

21) Hydrochloric acid 37% (HCl) (Lab-Scan®, A1107-G)

23) Methyl red ($C_{16}H_{15}N_3O_2$) (Rankem®, M0220)

24) Monopotassium phosphate (MKP, 0-52-34)

25) Nitric acid 65% AR. (HNO_3) (RCI-Labscan®, A8203)

26) Perchloric acid 70% AR. ($HClO_4$)(QRec®,P1005-1-251)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

27) Permount

28) Phenol AR. (CH_6H_5OH) (Rankem®, P0130)

29) Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) (Rankem®, P0320)

30) Potassium sodium (+) – tartrate, [$KNaC_4H_4O6.4H_2O$] (Fisher®, P26880253)

31) Salicylic acid ($C_7H_6O_3$) (Rankem®, S2042)

32) Sulfuric acid 95-97 % (H_2SO_4) (Merck®, 100731)

33) Sodium - nitroprusside ($Na_2[Fe(CN)_5NO].2H_2O$)) (Ajax®, 494)

34) Sodium hypochlorite 10% (NaClO)

35) Sodium chloride (NaCl) AR. (RCI-Labscan®, AR.1166-P)

36) Stanous chloride ($SnCl_2.2H_2O$) (Fisher®,T/1654/50)

37) Sodium hydroxide (NaOH) (Merck®, 1064988)

38) Sodium sulfate anhydrous (Na_2SO_4) (Rankem®,S0415)

39) Sodium carbonate anhydrous (Na_2CO_3) (Ajax®, 463)

40) Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) (Merck®, 106329)

41) tri-Sodium orthophosphate ($Na_3PO_4.2\ H_2O$) (Ajax®, 2220)

42) Tissue freezing medium (Jung®,008838)

43) Xylene (J.T.Baker®, 1330-20-7)

3.3 วิธีการทดลอง

ต้นลำไยพันธุ์ดอที่ได้รับการตัดแต่งกิ่งเปิดกลางทรงพุ่มเพื่อให้แสงแดดส่องทั่วถึง และมีระยะการแตกใบอ่อน 2 ชุดก่อนเริ่มกรรมวิธีการศึกษา จากนั้นวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) จำนวน 4 กรรมวิธี มี 5 ซ้ำ โดยใช้ 1 ต้นต่อ 1 หน่วยการทดลอง ดังต่อไปนี้

กรรมวิธีที่ 1 กรรมวิธีควบคุม

กรรมวิธีที่ 2 ราดโพแทสเซียมคลอเรต ($KClO_3$)ทางดิน อัตรา 15 กรัมต่อตารางเมตร

กรรมวิธีที่ 3 พ่นทางใบด้วยโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต(0-52-34) เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับเอทิฟอน ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 4 ราดโพแทสเซียมคลอเรต ($KClO_3$)ทางดินด้วยอัตรา 15 กรัมต่อตารางเมตร ร่วมกับพ่นทางใบด้วยโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต(0-52-34) เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับเอทิฟอน ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อใบลำไยชุดที่ 2 อยู่ในระยะใบเพสลาด ให้ทำการพ่นปุ๋ยทางใบด้วย 0-52-34 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับเอทิฟอน ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 3 ครั้ง ห่างกัน 7 วัน และราด $KClO_3$ ทางดิน อัตรา 15 กรัมต่อตารางเมตร แล้วปล่อยให้ต้นลำไยออกดอก

3.4 การบันทึกผลการทดลอง

3.4.1 การศึกษาข้อมูลทางกายภาพ

นับวันที่ราด $KClO_3$ ทางดินเป็นวันที่ 0 แล้วปล่อยให้ต้นลำไยออกดอก บันทึกจำนวนวันที่ใช้ในการออกดอกหลังราด $KClO_3$ เมื่อต้นลำไยเริ่มแทงช่อดอก ทำการตรวจนับการออกดอกโดยคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การออกดอก (เปอร์เซ็นต์การออกดอก = (จำนวนยอดที่ออกดอก × 100)/จำนวนยอดทั้งหมด) จากนั้นสุ่มห่อช่อดอกด้วยถุงตาข่ายไนล่อนที่จัดทำขึ้นเองเพื่อวัดขนาดช่อดอก ตรวจนับจำนวนดอกต่อช่อ เพศดอกโดยแบ่งเป็นดอกเพศผู้ และดอกสมบูรณ์เพศ รวมทั้งนับจำนวนผลต่อช่อโดยคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การติดผล (เปอร์เซ็นต์การติดผล = (จำนวนผลต่อช่อ x 100) / จำนวนดอกสมบูรณ์เพศ)

3.4.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของตายอด ดัดแปลงจากกรรมวิธีของ Johanson (1940)

เก็บตัวอย่างปลายยอดลำไยในวันที่ 0 10 20 และ 30 หลังจากราด $KClO_3$ โดยตัดยอดลำไยยาวประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร และแช่ในน้ำยารักษาสภาพ (formalin-acetic acid alcohol, FAA) จากนั้นนำเนื้อเยื่อที่แช่ในน้ำยารักษาสภาพมาทำการตัดเนื้อเยื่อด้วยวิธี Frozen section โดยดัดแปลงจากกรรมวิธีของ Johanson (1940) นำชิ้นส่วนฝังลงในน้ำยา (Tissue freezing medium) เพื่อยึดเนื้อเยื่อ นำไปตัดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่อง Freezing microtome จากนั้นนำไปย้อมสี Delafield's hematoxylin ปิด cover slip บนกระจกสไลด์ โดยใช้ permount บันทึกภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.4.3 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาในต้นพืช

ได้แก่ 1) การเปลี่ยนแปลงปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้าง และ 2) การเปลี่ยนแปลงปริมาณธาตุอาหารพืช (ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม) โดยมีวิธีการดังต่อไปนี้

1) การเก็บตัวอย่างพืช

สุ่มเก็บตัวอย่างปลายยอด ใบ และกิ่งปลายยอดลำไยของทุกกรรมวิธี ในวันที่ 0 10 20 และ 30 หลังจากราด $KClO_3$ จากนั้นนำตัวอย่างพืชมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2) การเปลี่ยนแปลงปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้าง (Total Non-structural Carbohydrate; TNC)

(1) วิธีการสกัด TNC ของ Smith *et al*. (1964) และดัดแปลงโดย สุจริต (2531)

ชั่งตัวอย่างพืชที่อบแห้งสนิท และบดละเอียดแล้ว 0.05 กรัม เติม 0.2 N H_2SO_4 มิลลิลิตร ปิดปากหลอดทดลองด้วยอะลูมิเนียมฟรอยด์ แล้วอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ใน Hot air oven จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย 0.1 1 และ 2 N NaOH และ 0.5 และ 5 % H_2SO_4 แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman® เบอร์ 5 เก็บใส่ขวดพลาสติกขนาด 60 มิลลิลิตร เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

(2) วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณ TNC โดยวิธีของ Nelson's reducing sugar procedure (AOAC, 1990)

ดูดสารละลายที่สกัดได้จากตัวอย่าง หลอดละ 1 มิลลิลิตร เติม Nelson's alkaline copper reagent จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปิดด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์ นำไปแช่ใน water bath อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็น แล้วเติมสารละลาย arsennomolybdic acid reagent จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ตะกอนของ CuO_2 ละลายจนหมด เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำสารละลายไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (absobance) จากเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน แล้วคำนวณเป็นปริมาณมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของD-glucose ต่อน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง

<u>การเตรียมสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน</u>

สารละลายน้ำตาลมาตรฐานเตรียมโดยดูดสารละลาย D-Glucose เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมา 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้สารละลายน้ำตาลมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.025, 0.050, 0.075, 0.100, 0.125, 0.150, 0.175, 0.200, 0.225 และ 0.250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3) การเปลี่ยนแปลงปริมาณธาตุอาหารพืช (ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม)

(1) การย่อยตัวอย่างพืชสำหรับการวิเคราะห์ธาตุอาหารพืช ดังนี้

<u>ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส</u> ดัดแปลงโดย Ohyama *et al.* (1985; 1986)

ชั่งตัวอย่างพืชอบแห้งบดละเอียด 0.05 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง เติม H_2SO_4 เข้มข้น 1 มิลลิลิตร เทลงในหลอดที่ใส่ตัวอย่างไว้ ปิดหลอดด้วยพาราฟิล์ม ทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมานำมาย่อยที่เตาย่อยตัวอย่างพืช ปรับอุณหภูมิที่ 180 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แล้วเติม H_2O_2 หลอดละ 0.3 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากัน นำมาย่อยต่อโดยปรับอุณหภูมิเป็น 230 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หากสารละลายยังไม่ใสให้เติม H_2O_2 หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร ทุกๆ 30 นาที ทำซ้ำเดิมจนกระทั่งสารละลายใส หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมานำมาปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร แล้วเก็บสารละลายที่ได้ไว้ในขวดพลาสติก เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับวิเคราะห์ต่อไป

<u>โพแทสเซียม</u> (Mizukoshi *et al*., 1994)

ชั่งตัวอย่างพืชอบแห้งบดละเอียด 0.05 กรัม เติม $HClO_4$ 0.4 มิลลิลิตร และ HNO_3 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ เขย่าให้เข้ากัน ปิดหลอดด้วยพาราฟิล์ม ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นนำมาย่อยที่ 100 องศาเซลเซียส เพื่อไล่ควันสีเหลืองของ NO_2^- ออกจนหมด จึงปรับเพิ่มอุณหภูมิเป็น 210 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้จนตัวอย่างแห้งระวังอย่าให้ไหม้ นำออกมาทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมสารละลายเจือจางของไฮโดรคลอริก (HCl (1) : H_2O (4) มิลลิลิตร) หลอดละ 1 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากัน แล้วนำมาตั้งบนเตาที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อไล่ Cl^- ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำมาปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร เทใส่ขวดพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องสำหรับวิเคราะห์ต่อไป

(2) วิธีการวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารพืช

<u>ไนโตรเจน</u> (Indolphenol Method) (Ohyama *et al*., 1985; 1986)

(ก) เตรียมสารละลายที่ใช้ตรวจสอบปริมาณไนโตรเจน จำนวน 4 ชนิด

<u>A reagent</u> : ชั่ง EDTA.2Na 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับ pH ให้เป็น 10 จากนั้นเติมสารละลาย methyl red 20 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

<u>B reagent</u> : ชั่ง KH_2PO_4 136.09 กรัม และ benzoic acid 2.75 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

<u>C reagent</u> : ชั่ง Na_2 (Fe (CN)$_5$ NO)·$2H_2O$ (Sodium nitroprusside) 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นเติมฟีนอล 10.25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็น สารละลายนี้มีอายุการใช้งาน 2 สัปดาห์

<u>D reagent</u> : ชั่ง NaOH 10 กรัม $Na_2HPO_4·7H_2O$ 7.06 กรัม และ $Na_3PO_4·12H_2O$ 31.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เติม NaClO 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น1,000 มิลลิลิตร

(ข) เตรียม NaOH เข้มข้น 1 N เพื่อปรับความเป็นด่าง

(ค) เตรียมสารละลายมาตรฐานจาก $(NH_4)_2SO_2$ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

(ง) ดูดตัวอย่างที่ย่อยได้ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติม A reagent 0.5 มิลลิลิตร และเติม B reagent 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ นำมาไตเตรทโดยหยด 1 N NaOH ลงไป เขย่าเล็กน้อยให้เปลี่ยนสี จากนั้นเติม C reagent 2.5 มิลลิลิตร และ D reagent 2.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ 625 นาโนเมตร บันทึกผลแล้วนำค่าที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานตามกฎของ Beer's-Lambert's Law จากนั้นนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) โดยใช้สูตรคำนวณ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างพืช} = 0.714 \times (a-b) \times \frac{v}{w}$$

a = ค่าความเข้มข้นของไนโตรเจนในสารละลายตัวอย่างพืช (mg/l)

b = ค่าความเข้มข้นของไนโตรเจนใน blank (mg/l)

v = ปริมาตรสุดท้ายของการย่อยตัวอย่างพืช (ml)

w = น้ำหนักแห้งตัวอย่างที่ใช้ย่อย (กรัม)

ฟอสฟอรัส

ใช้การวิเคราะห์ปริมาณธาตุฟอสฟอรัสโดยการดูดกลืนแสงของสารที่มีสี (colorimetry) (Ohyama *et al*., 1991) ซึ่งได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างฟอสเฟต และอนุมูลโมลิบเดต ดังนี้

(ก) เตรียมสารละลายที่ใช้ตรวจสอบปริมาณฟอสฟอรัส จำนวน 3 ชนิด ดังนี้

A reagent : ชั่ง $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร จากนั้นนำมากรองโดยใช้ ระบบสุญญากาศช่วย

B reagent : เตรียม H_2SO_4 250 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 500 มิลลิลิตร

C reagent : นำ A reagent มาผสม B reagent โดยเท B reagent ลงใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บีกเกอร์ ขนาด 1 มิลลิลิตร ค่อยๆ เท A reagent ทีละน้อย ช้าๆ ทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมานำมาปรับปริมาตรให้เป็น 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาตั้งไว้ในที่มืด

(ข) เตรียมสารละลายสแตนนัสคลอไรด์ โดยชั่ง ($SnCl_2.2H_2O$) 0.25 กรัม เทลงในขวดสีชา (ควรเตรียมในตู้ควัน) โดยเติม HCl 5 มิลลิลิตร ละลายให้หมด จากนั้นเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร

(ค) เตรียมสารละลายมาตรฐานของฟอสฟอรัสจาก KH_2PO_4 ปรับให้มีความเข้มข้นตามลำดับคือ 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

(ง) ดูดสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการย่อยปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อย เติม C reagent ขวดละ 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ 660 นาโนเมตร นำค่าที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของฟอสฟอรัส จากนั้นนำค่าที่คำนวณหาปริมาณฟอสฟอรัส (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) โดยใช้สูตรคำนวณเช่นเดียวกับการหาปริมาณไนโตรเจน

$$\text{ปริมาณฟอสฟอรัสในตัวอย่างพืช} = 0.323 \times (a-b) \times \frac{v}{w}$$

a = ค่าความเข้มข้นของไนโตรเจนในสารละลายตัวอย่างพืช (mg/l)

b = ค่าความเข้มข้นของไนโตรเจนใน blank (mg/l)

v = ปริมาตรสุดท้ายของการย่อยตัวอย่างพืช (ml)

w = น้ำหนักแห้งตัวอย่างที่ใช้ย่อย (กรัม)

<u>โพแทสเซียม</u>

(ก) เตรียมสารละลายมาตรฐานของโพแทสเซียม ปรับให้มีความเข้มข้น 0 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

(ข) เจือจางสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการย่อย โดยใช้สารตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 25 มิลลิลิตร

(ค) นำสารละลายดังกล่าวไปวัดปริมาณโพแทสเซียมโดยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 766.5 นาโนเมตร บันทึกผล และนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณโพแทสเซียม (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$\text{ปริมาณโพแทสเซียมในตัวอย่างพืช} = 0.256 \times (a-b) \times \frac{v}{w}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

a = ค่าความเข้มข้นของโพแทสเซียมในสารละลายตัวอย่างพืช (mg/l)

b = ค่าความเข้มข้นของโพแทสเซียมใน blank (mg/l)

v = ปริมาตรสุดท้ายของการย่อยตัวอย่างพืช (ml)

w = น้ำหนักแห้งตัวอย่างที่ใช้ย่อย (กรัม)

3.4.4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณธาตุอาหารหลักในดิน

1) วิธีการเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินที่ระดับความลึก 0-15 เซนติเมตร บริเวณรอบทรงพุ่มเมื่อลำไยอยู่ในระยะใบแก่ก่อนราดโพแทสเซียมคลอเรต และหลังราด $KClO_3$ จากนั้นนำดินผึ่งให้แห้งในที่ร่ม และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร เพื่อรอการวิเคราะห์หาปริมาณธาตุอาหารในดิน

2) วิธีการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด(total-N) โดยวิธี Indophenol blue method หรือ Colorimetry method (Novozamky *et al*., 1974)

(ก) วิธีการสกัดดิน (Mulvaney, 1996)

ชั่งดิน 10 กรัม เติมสารละลาย KCI 1 N 100 มิลลิลิตร. ปิดจุกแล้วเขย่า 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5

(ข) วิธีการวิเคราะห์ดิน

<u>ขั้นตอนการเตรียมสารละลาย</u>

<u>สารละลาย A</u> 10 M NaOH

<u>สารละลาย B</u> Salicylic acid 110 กรัม ใน 10 M NaOH 105 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตร. ด้วยน้ำกลั่น(เตรียมก่อนใช้ในวันนั้นใช้วันต่อวัน)

<u>สารละลาย C</u> Buffer pH 12.3

Na_2HPO_4 (anhydrous) 13.35 กรัมละลายในน้ำกลั่น เติม 40 % NaOH (10 NaOH) 5 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 12.3 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร

<u>สารละลาย D</u> 4% EDTA

<u>สารละลาย E</u> Sodium hypochlorite 1 M ใน 0.1 M NaOH

Sodium hypochlorite 258.66 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

10 M NaOH 5 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้เป็น 500 มล.ใน volumetric flask ด้วยน้ำกลั่น(เก็บไว้ได้)การนำไปใช้ให้เจือจาง Sodium hypochlorite 1 M ใน 0.1 M NaOH 20มล. ปรับปริมาตรเป็น 100 มล.ด้วยน้ำกลั่น (เตรียมก่อนใช้)

สารละลาย F Sodium nitroprusside 50 มิลลิกรัม.(0.05 กรัม) ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้)

สารละลาย G การเตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 2,500 มิลลิกรัม/ลิตร (stock solution)

$(NH_4)_2SO_4$ 11.739 กรัม ปรับปริมาตรน้ำกลั่นเป็น 1000 มิลลิลิตร

เจือจางสารละลายมาตรฐานให้ได้ความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15.0 มิลลิกรัม/ลิตรตามลำดับ

สารละลาย H การเตรียมสารละลาย 1 และ 2

สารละลาย 1 ประกอบด้วยสารเคมีข้อ B , F และ D

อัตราส่วน 50 มิลลิลิตร : 100 มิลลิลิตร: 5 มิลลิลิตร รวม 155 ใช้ 3 มิลลิลิตร/ตัวอย่าง

สารละลาย 2 ประกอบด้วยสารเคมีข้อ C และ E

อัตราส่วน 200 มิลลิลิตร :50 มิลลิลิตร รวม 250 มิลลิลิตร ใช้ 5 มิลลิลิตร/ตัวอย่าง

สารละลายทั้งสองสามารถใช้ได้ประมาณ 50 ตัวอย่าง

ขั้นตอนการวิเคราะห์

1) ดูดสารละลายดินลงในหลอดทดลอง 0.2 มิลลิลิตร (สำหรับ standard ใช้สารละลายมาตรฐานที่เจือจางไว้อย่างละ 0.2 ส่วน blank (2 ซ้ำ) ใช้น้ำกลั่น 0.2 มิลลิลิตร

2) เติมสารละลาย 1 ปริมาตร 3 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน

3) เติมสารละลาย 2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน

4) ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง (รอพัฒนาสีอย่างสมบูรณ์) หลังจากนั้นนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วย spectrophotometer ที่ 660 นาโนเมตร นำค่าที่อ่านได้คำนวณหาปริมาตรไนโตรเจนทั้งหมดจากสมการ

$$\text{Total N (\%)} = \frac{C \times V \times \text{dilution factor} \times 100}{10^6 \times W}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

C = ความเข้มข้น Nในตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับ standard curve-N (ppm)

V = ปริมาตรของ stock solution ของตัวอย่างที่ปรับปริมาตรแล้ว (ml)

W = น้ำหนักดินแห้ง (กรัม)

3) วิธีการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสที่สามารถใช้ประโยชน์ได้ (available-P) (Houba *et al.*, 1988)

ขั้นตอนการเตรียมสารละลาย

(1) เตรียมสารละลาย Bray II

ชั่ง NH_4F จำนวน 1.11 กรัม ปรับปริมาตรด้วย HCl 0.1 N (เตรียมได้จาก conc.HCl 8.28 มิลลิลิตร นำมาปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร) จนได้ปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วย volumetric flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร

2) เตรียมสารละลาย Reagent A

ชั่ง Ammonium molybdate จำนวน 12 กรัม เติมน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร นำไปอุ่นจนกระทั่งละลาย จะได้สารละลาย (a) สำหรับสารละลาย (b) เตรียมได้จากการชั่ง antimony potassium tartrate ($KSbO.C_4H_4O_7$) จำนวน 0.2908 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นผสมสารละลาย (a) และสารละลาย (b) เข้าด้วยกันใน volumetric flask ขนาด 2,000 มิลลิลิตร เติม H_2SO_4 5 N (เตรียมได้จาก conc. H_2SO_4 จำนวน 141 มิลลิลิตร. หรือ 98% H_2SO_4 จำนวน 136.24 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเสร็จแล้วเก็บไว้ในขวดสีน้ำตาลและนำไปแช่ไว้ในตู้เย็น

(3) เตรียมสารละลาย Reagent B

ชั่ง Ascorbic acid จำนวน 1.056 กรัม เติมสารละลาย Reagent A จำนวน 200 มิลลิลิตร ซึ่ง Reagent B นี้จะมีอายุการใช้งานไม่เกิน 24 ชั่วโมง

(4) เตรียมสารละลาย standard curve-P ที่มีความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ใช้ volumetric pipette ดูดสารละลาย standard-P 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Reagent B จำนวน 4 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย Bray II จำนวน 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (% Absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร บันทึกผล

ขั้นตอนการวิเคราะห์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชั่งดิน 2.5 กรัม ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด.125 มิลลิลิตร ใส่สารละลาย Bray II จำนวน 25 มิลลิลิตร เติมลงไปแล้วเขย่าด้วยมือเป็นเวลา 1นาที หลังจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 ดูดสารละลายที่กรองได้ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Reagent B จำนวน 4 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย Bray II จำนวน 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (% Absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตรนำค่าที่อ่านได้มาคำนวณหาปริมาณฟอสฟอรัสจากสมการ

$$P\ (mg/L) = \frac{C \times V_f \times V_d}{V_a \times W}$$

C = ความเข้มข้น P ในตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับ standard curve-P (ppm)

V_f = ปริมาตรสุดท้ายที่นำมาวิเคราะห์ (ml)

V_d = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการสกัดดิน (ml)

V_a = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ (ml)

W = น้ำหนักดินแห้ง (กรัม)

4) วิธีการวิเคราะห์ปริมาณโพแทสเซียมที่สามารถแลกเปลี่ยนได้(exchangeable-K) (Helkme and Sparke, 1996)

ขั้นตอนการเตรียมสารละลาย

(1) เตรียมสารละลาย Ammonium acetate (CH_3COONH_4) 1 N pH 7

ชั่ง CH_3COONH_4 จำนวน 77.08 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัด pH และปรับ pH ให้เป็น 7 โดยใช้ NH_3-solution หรือ acetic acid แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

(2) เตรียม standard curve ให้มีความเข้มข้นของ K เป็น 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ใช้ volumetric pipette ดูดสารละลาย standard-K 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มาจำนวน 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติม CH_3COONH_4 1 N pH 7 จำนวน 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปอ่านด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrophotometer

ขั้นตอนการวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างดิน 4 กรัมใส่ในหลอดทดลองเติมสารละลาย CH_3COONH_4 1 N pH 7 จำนวน 40 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 30 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 หลังจากนั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ดูดสารละลายที่กรองได้ 5 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น นำไปอ่านด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrophotometer บันทึกผลแล้วนำมาคำนวณหาปริมาณ K ที่สามารถแลกเปลี่ยนได้ดังสมการ

$$K\ (mg/L) = \frac{C \times V_f \times V_d}{V_a \times W}$$

C = ความเข้มข้น K ในตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับ standard curve-K (ppm)

V_f = ปริมาตรสุดท้ายที่นำมาวิเคราะห์ (ml)

V_d = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการสกัดดิน (ml)

V_a = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ (ml)

W = น้ำหนักดินแห้ง (กรัม)

3.5 สถานที่ใช้ในการดำเนินทดลอง

3.5.1. แปลงทดลอง

แปลงทดลองไม้ผล สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืชและภูมิทัศน์ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตจันทบุรี อ. เขาคิชฌกูฏ จ. จันทบุรี

3.5.2. ห้องปฏิบัติการ

1) ห้องปฏิบัติการ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืชและภูมิทัศน์ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตจันทบุรี

2) ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3) ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.6 ระยะเวลาที่ใช้ในการดำเนินการทดลอง

พฤษภาคม 2553 – ธันวาคม 2554

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ SXW for Windows

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved