บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 ทดลองการขาดธาตุสังกะสีโดยปลูกส้มในสารละลายธาตุอาหาร (hydroponics)

ทดลองนำส้มโชกุนปลอดโรคและส้มโชกุนที่เป็นโรคกรีนนิ่งมาปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่ต่างกัน 2 ชนิด คือ สารละลายธาตุอาหารที่มีธาตุสังกะสีและไม่มีธาตุสังกะสี โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Random Design; CRD) ประกอบด้วย 4 กรรมวิธี ๆ ละ 10 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ส้มปลอดโรคปลูกในสารละลายที่มีธาตุสังกะสี (ปลอดโรค + Zn)

กรรมวิธีที่ 2 ส้มเป็นโรคกรีนนิ่งปลูกในสารละลายที่มีธาตุสังกะสี (เป็นโรค + Zn)

กรรมวิธีที่ 3 ส้มปลอดโรคปลูกในสารละลายที่ไม่มีธาตุสังกะสี (ปลอดโรค – Zn)

กรรมวิธีที่ 4 ส้มเป็นโรคกรีนนิ่งปลูกในสารละลายที่ไม่มีมีธาตุสังกะสี (เป็นโรค – Zn)

ทั้งนี้สารละลายธาตุอาหารที่ใช้ทดลองจะมีชนิดและปริมาณของธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตเหมือนกันทุกประการ ยกเว้นธาตุสังกะสี

3.1.1 การเตรียมสารละลายธาตุอาหาร

เตรียมสารละลายธาตุอาหารในรูปสารละลายเข้มข้น (stock solutions) ปริมาตร 10 ลิตร แบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ สารละลาย A สารละลาย B ที่มีธาตุสังกะสี (B + Zn) และสารละลาย B ที่ไม่มีธาตุสังกะสี (B – Zn) โดยสารละลายเข้มข้นแต่ละชนิดประกอบด้วยธาตุอาหารต่าง ๆ ดังนี้

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของธาตุอาหารต่าง ๆ สำหรับเตรียม stock solutions ปริมาตร 10 ลิตร

ชนิดปุ๋ย	สูตรเคมี	ธาตุอาหาร	ความเข้มข้น (mg/L หรือ ppm)
สาร A			
1. แคลเซียมไนเตรต	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$ (12%)	Ca^{++}, NO_3	164.00
2. เหล็กคีเลต	Fe – EDTA (13.2%)	Fe	0.84
สาร B			
1. โพแทสเซียมไนเตรต	KNO_3	K, NO_3^-	998.20
2. โพแทสเซียมฟอสเฟต	KH_2PO_4	K, $H_2PO_4^-$	155.20
3. แมกนีเซียมซัลเฟต	$MgSO_4.7H_2O$	Mg, $SO_4^=$	153.60

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชนิดปุ๋ย	สูตรเคมี	ธาตุอาหาร	ความเข้มข้น (mg/L หรือ ppm)
สาร B			
4. สังกะสีซัลเฟต	$ZnSO_4.7H_2O$ (22%)	Zn	0.33
5. คอปเปอร์ซัลเฟต	$CuSO_4.H_2O$	Cu	0.05
6. แมงกานีสซัลเฟต	$MnSO_4.H_2O$	Mn	0.55
7. กรดบอริก	H_3BO_3	B	0.27
8. แอมโมเนียมโมลิบเดต	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	Mo	0.05

ที่มา : NutriCal V1.6T โปรแกรมการคำนวณและผสมสารละลายธาตุอาหารพืชในการปลูก ระบบ hydroponics โดย รศ.ดร.อิทธิสุนทร นันทกิจ ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง http://kmitl.ac.th/hydro/download.html

เตรียม stock solution A โดยละลายแคลเซียมไนเตรตและเหล็กคีเลตในน้ำสะอาด แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 ลิตร ปรับ pH ของสารละลายให้ได้ประมาณ 4 ด้วยกรดไนตริก (HNO_3 65% เจือจาง 10 เท่า) สำหรับ stock solution B ทั้ง 2 ชนิด ให้ละลายส่วนผสมในน้ำสะอาดแล้วปรับปริมาตรเป็น 10 ลิตร เช่นกัน โดยไม่ต้องปรับ pH ของสารละลาย ทั้งนี้ stock solution B ที่ไม่มีธาตุสังกะสีจะไม่เติมสังกะสีซัลเฟตลงไปในสารละลาย เมื่อได้สารละลายเข้มข้นแล้วเทผ่านผ้าขาวบางเพื่อกรองเศษสิ่งสกปรกที่ติดมากับปุ๋ย เก็บไว้ในขวดพลาสติกที่มีฝาปิด

3.1.2 การปลูกส้มในสารละลายธาตุอาหาร

ทำการปลูกส้มโชกุนปลอดโรคและส้มโชกุนที่เป็นโรคกรีนนิ่งในสารละลาย บริเวณโรงเรือนปลูกพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยเตรียมถังน้ำพลาสติกเบอร์ 30 ซึ่งมีความจุประมาณ 18 ลิตร สีดำหรือมีลักษณะทึบแสงเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดตะไคร่น้ำ วางถังพลาสติกเป็นแถวบนพื้นที่ปูด้วยผ้ายางพลาสติกสีดำ แถวละ 10 ถัง จำนวน 4 แถว แต่ละถังตั้งห่างกัน 1 เมตร ระยะห่างระหว่างแถว 1 เมตร เพื่อสะดวกในการปฏิบัติงาน จากนั้นเติมน้ำสะอาดลงไป 15 ลิตร ซึ่งระดับน้ำจะอยู่ต่ำกว่าขอบถังประมาณ 10 เซนติเมตร เติมสารละลายเข้มข้น A และ B ปริมาตรเท่ากันลงไป คนให้สารผสมเข้ากัน วัด EC (electrical conductivity) ให้อยู่ในช่วง 1.8 – 2.0 mS/cm ด้วยเครื่อง Nutrient Salts Meter (Truncheon™) หากค่า EC ต่ำกว่าค่าที่กำหนด ค่อย ๆ เติมสาร A และ B อย่างละเท่า ๆ กันเพิ่มเข้าไปจนได้ EC ตามต้องการ หลังจากนั้นจึงปรับ pH

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ของสารละลายให้อยู่ระหว่าง 5.5 – 6 ด้วยกรดไนตริกแบบเดียวกับที่ใช้เตรียม stock solutions ถังบรรจุสารละลายธาตุอาหารแต่ละถังจะมีสายยางที่ตรงปลายต่อเข้ากับหัวทรายจุ่มอยู่ โดยสายยางแต่ละเส้นจะต่อไปยังเครื่องปั้มอากาศ (air-pump) กำลัง 420 วัตต์ (Resun® model : AP-180) ซึ่งวางตั้งอยู่ตรงกลางของชุดทดลองทั้งหมดเพื่อให้อากาศกับรากส้ม และเนื่องจากลักษณะการวางปั้มอากาศดังกล่าว ทำให้ระยะห่างของถังบรรจุสารละลายแต่ละถังกับเครื่องปั้มอากาศไม่เท่ากันทุกถัง ส่งผลถึงความแรงของอากาศทำให้ถังที่อยู่ไกลได้รับอากาศน้อยกว่าถังที่อยู่ใกล้ปั้ม แก้ปัญหาด้วยการต่อวาล์วปรับปริมาณอากาศเข้ากับสายยางแต่ละถัง ซึ่งสามารถหมุนเพื่อปิดหรือคลายเกลียวให้อากาศผ่านไปยังหัวทรายในปริมาณใกล้เคียงกันได้ โดยเทียบจากปริมาณและความแรงของฟองอากาศที่เกิดขึ้นในแต่ละถัง ทั้งนี้อุปกรณ์จำพวกหัวทราย สายยาง วาล์วสำหรับปรับปริมาณอากาศ และปั้มอากาศ เป็นอุปกรณ์ ที่ประยุกต์ใช้มาจากการเลี้ยงปลาตู้

สำหรับการปลูกส้มในสารละลายที่เตรียมในข้างต้น จะต้องนำต้นส้มที่เตรียมไว้ซึ่งได้แก่ ส้มโชกุนปลอดโรคและส้มโชกุนที่เป็นโรคกรีนนิ่งที่ขยายพันธุ์ด้วยการติดตาบนต้นตอ อายุเฉลี่ยประมาณ 1 ปี มาล้างทำความสะอาดรากเพื่อกำจัดเศษวัสดุปลูกออกให้มากที่สุด แล้วจึงนำต้นส้มที่ได้ไปใส่ในถังสารละลายธาตุอาหาร โดยให้ตำแหน่งของโคนรากอยู่ระดับเดียวกับระดับสารละลายในถังหรืออยู่ปริ่มผิวน้ำ ยึดต้นส้มให้ตั้งตรงด้วยการผูกเชือกอย่างหลวม ๆ ที่ลำต้นแล้วพันขึ้นไปจนถึงยอด ผูกปลายเชือกติดกับเส้นลวดที่ขึงไว้เป็นแนวเหนือถังสารละลาย ปิดปากถังด้วยแผ่นพลาสติกสีดำป้องกันการระเหยน้ำออกจากถัง ให้อากาศผ่านหัวทรายตลอดเวลาและเปลี่ยนสารละลายธาตุอาหารใหม่ทุกเดือน

ระหว่างการทดลองถ้าส้มออกดอกหรือติดผลให้กำจัดทิ้ง ป้องกันไม่ให้พืชโทรมจากการให้ผลผลิต กรณีที่มีการระบาดของแมลงศัตรูส้มให้พ่นสารป้องกันกำจัดแมลงตามความเหมาะสม

3.1.2 การบันทึกข้อมูล

1. ความสูง วัดจากโคนรากจนถึงปลายยอด หน่วยการวัดเป็นเซนติเมตร เดือนละ 1 ครั้ง

2. ขนาดทรงพุ่ม วัดความกว้างของทรงพุ่ม 2 ด้าน ได้แก่ ทิศเหนือ – ใต้ และ ตะวันออก – ตะวันตก ในหน่วยเซนติเมตร เดือนละ 1 ครั้ง นำตัวเลขดังกล่าวมาหาค่าเฉลี่ย จะได้เป็นค่าที่แสดงขนาดของทรงพุ่ม

3. ค่าองศาสี (hue) ของใบตำแหน่งที่ 3 นับจากยอด จำนวน 3 ใบต่อต้น ด้วยเครื่อง chromameter (Minolta CR 300) ซึ่งจะได้ตัวเลข 3 ค่า ประกอบด้วยค่าต่าง ๆ ดังนี้

L* คือ ค่าความสว่าง มีค่าตั้งแต่ 0 – 100 หมายถึง มืด – ขาวสว่าง

a* คือ ค่าสีตามแกนนอน มีค่าตั้งแต่ +60 ถึง –60 หมายถึง สีม่วงแดง – สีเขียวอมน้ำเงิน

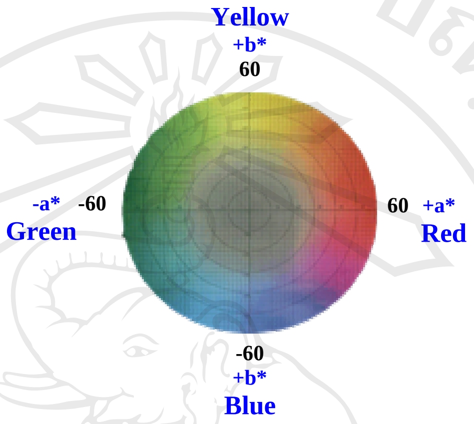
b* คือ ค่าสีตามแกนตั้ง มีค่าตั้งแต่ +60 ถึง –60 หมายถึง สีเหลือง – สีน้ำเงิน

ตัวเลขที่วัดได้จะนำมาคำนวณเพื่อหาค่าองศาของสี (hue) ตามสมการดังต่อไปนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

กรณี a* และ b* มีค่าเป็น +	hue = arctangent b*/ a*
กรณี a* และ b* มีค่าเป็น –	hue = 270 – arctangent b*/ a*
กรณี a* มีค่าเป็น + และ b* มีค่าเป็น –	hue = 360 – arctangent b*/a*
กรณี a* มีค่าเป็น – และ b* มีค่าเป็น +	hue = 180 – arctangent b*/a*

ค่าองศาของสีที่ได้จะนำไปเทียบกับไดอะแกรมเพื่อหาช่วงสีที่วัดได้ว่าอยู่ในช่วงสีใด (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ไดอะแกรมที่ใช้เปรียบเทียบกับค่าองศาของสี (hue)

4. การวิเคราะห์ปริมาณธาตุสังกะสีในใบส้ม

เก็บตัวอย่างใบส้มที่แก่เลยระยะเพสลาดหรือใบในตำแหน่งที่ 3 – 4 นับจากยอด มาล้างทำสะอาดและซับให้แห้ง ใส่ในซองกระดาษสีน้ำตาลขนาดเล็ก นำไปอบแห้งในตู้ hot air oven อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (°C) นาน 1 คืน บดตัวอย่างใบที่อบแล้วจนเป็นผงละเอียด แล้วชั่งผงตัวอย่างประมาณ 0.5 กรัม ใส่ขวดแก้วรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 50 มิลลิลิตร ปิดปากขวดด้วยกรวยแก้วขนาดเล็ก จากนั้นย้ายไปวางในตู้ดูดควัน เติมสารละลายสำหรับย่อยตัวอย่าง (HNO_3 : $HClO_3$ = 6:1) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร วางขวดดังกล่าวไว้บน hot plate อุณหภูมิ 150 °C เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 30 นาที จึงปรับอุณหภูมิเป็น 200 °C และ 250 °C เป็นอุณหภูมิสุดท้าย ตัวอย่างในขวดจะถูกย่อยด้วยกรดและความร้อนเกิดควันสีน้ำตาล ตั้งขวดทิ้งไว้บน hot plate จนกว่าสารละลายจะมีสีใสและควันกลายเป็นสีขาว ซึ่งจะเหลือสารละลายประมาณ 1 มิลลิลิตร ยกขวดออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ใช้น้ำกลั่นฉีดล้างของเหลวข้างในใส่ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 50 มิลลิลิตร เทสารที่ปรับปริมาตรเรียบร้อยแล้วเก็บไว้ในขวดพลาสติกปิดฝาให้เรียบร้อย เพื่อนำไปอ่านค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง atomic absorption spectrometry

การอ่านค่าการดูดกลืนแสง ในเบื้องต้นจะต้องเตรียมสารละลายสังกะสีความเข้มข้นมาตรฐาน (standard Zn) ความเข้มข้น 0.1 0.2 0.3 ppm (part per million) และ blank โดยใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สารละลาย $Zn(NO_3)$ (1000 ppm in HNO_3 0.5 mol/L) ซึ่งสารที่เตรียมทั้งหมดจะต้องมีกรดไนตริก (HNO_3) ผสมอยู่ 0.5 mol/L เท่ากับ $Zn(NO_3)$ ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการเตรียม ก่อนนำตัวอย่างมาอ่านค่าดูดกลืนแสงควรเปิดเครื่องล่วงหน้าไว้ประมาณ 15 นาที จึงเริ่มอ่าน blank ตามด้วย standard Zn ความเข้มข้น 0.1 0.2 และ 0.3 ppm ตามลำดับ แล้วจึงอ่านสารละลายของตัวอย่างที่ย่อยได้ในข้างต้นต่อไปจนครบ

นำค่าดูดกลืนแสงของ blank และ standard Zn มาสร้างกราฟมาตรฐาน จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงของแต่ละตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับกราฟ และคำนวณกลับหาปริมาณธาตุสังกะสีของใบในหน่วย ppm

ตัวเลขที่ได้จากการทดลองนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยโปรแกรมสถิติ Statistix 8.0 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี least significant difference (LSD)

หมายเหตุ : เทคนิคการสกัดตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ธาตุอาหาร อ้างจาก

Analysis of Major, Minor and Trace Elements in Plant Tissue Samples with ICP-OES and ICP-MS http://uwlab.soil.wisc.edu/madison/

3.2 ทดลองการขาดธาตุสังกะสีโดยปลูกส้มในทราย (sand culture)

นำส้มโชกุนปลอดโรคและส้มโชกุนที่เป็นโรคกรีนนิ่งมาปลูกในทราย และให้สารละลายธาตุอาหารแบบน้ำหยด โดยจัดหน่วยทดลองแบบแฟคทอเรียล (factorial experiment) ประกอบด้วยปัจจัยในการทดลองทั้งหมด 3 ปัจจัย แต่ละปัจจัยทำ 7 ซ้ำ ดังนี้

1. ชนิดส้ม 2 ชนิด ได้แก่
   - ส้มโชกุนปลอดโรคติดตาด้วยตาส้มปลอดโรค (D_0)
   - ส้มโชกุนปลอดโรคติดตาด้วยตาส้มที่เป็นโรคกรีนนิ่ง (D_1)
2. สารละลายธาตุอาหาร 2 ชนิด ได้แก่
   - สารละลายธาตุอาหารที่มีธาตุสังกะสี (+Zn)
   - สารละลายธาตุอาหารที่ไม่มีธาตุสังกะสี (–Zn)
3. ธาตุฟอสฟอรัส (P) 3 ระดับ
   - ไม่เติมธาตุฟอสฟอรัสเพิ่ม (P)
   - เติมธาตุฟอสฟอรัสเพิ่ม 1000 ppm (P1)
   - เติมธาตุฟอสฟอรัสเพิ่ม 2000 ppm (P2)

ธาตุฟอสฟอรัส ใช้ในรูปของปุ๋ยทริเปิลซุปเปอร์ฟอสเฟต (triplesuperphosphate; TSP) เพื่อช่วยลดประสิทธิภาพของต้นส้มในการดูดธาตุสังกะสี ทำให้ส้มดูดใช้สังกะสีได้น้อยยิ่งขึ้น กรณีที่ไม่เติมฟอสฟอรัส หมายถึง การไม่เติมปุ๋ยทริเปิลซุปเปอร์ฟอสเฟตเพิ่มเข้าไปในวัสดุปลูก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ซึ่งก็คือทราย แต่พืชได้รับธาตุฟอสฟอรัสที่มีอยู่แล้วในสารละลายธาตุอาหารเช่นเดียวกับกรรมวิธีอื่น ทั้งนี้การทดลองประกอบด้วย treatment combination ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ส้มปลอดโรคติดตาด้วยตาส้มปลอดโรค ให้สารละลายที่ไม่มีธาตุสังกะสี และไม่เติมฟอสฟอสรัสเพิ่ม (D_0 – Zn + P)

กรรมวิธีที่ 2 ส้มปลอดโรคติดตาด้วยตาส้มปลอดโรค ให้สารละลายที่ไม่มีธาตุสังกะสี และเติมฟอสฟอสรัสเพิ่ม 1000 ppm (D_0 – Z n + P1)

กรรมวิธีที่ 3 ส้มปลอดโรคติดตาด้วยตาส้มปลอดโรค ให้สารละลายที่ไม่มีธาตุสังกะสี และเติมฟอสฟอสรัสเพิ่ม 2000 ppm (D_0 – Zn + P2)

กรรมวิธีที่ 4 ส้มปลอดโรคติดตาด้วยตาส้มที่เป็นโรคกรีนนิ่ง ให้สารละลายที่ไม่มีธาตุสังกะสี และไม่เติมฟอสฟอสรัสเพิ่ม (D_1 – Zn + P)

กรรมวิธีที่ 5 ส้มปลอดโรคติดตาด้วยตาส้มที่เป็นโรคกรีนนิ่ง ให้สารละลายที่ไม่มีธาตุสังกะสี และเติมฟอสฟอสรัสเพิ่ม 1000 ppm (D_1 – Zn + P1)

กรรมวิธีที่ 6 ส้มปลอดโรคติดตาด้วยตาส้มที่เป็นโรคกรีนนิ่ง ให้สารละลายที่ไม่มีธาตุสังกะสี และเติมฟอสฟอสรัสเพิ่ม 2000 ppm (D_1 – Zn + P2)

กรรมวิธีที่ 7 ส้มปลอดโรคติดตาด้วยตาส้มปลอดโรค ให้สารละลายที่มีธาตุสังกะสี และไม่เติมฟอสฟอสรัสเพิ่ม (D_0 + Zn + P)

กรรมวิธีที่ 8 ส้มปลอดโรคติดตาด้วยตาส้มปลอดโรค ให้สารละลายที่ไม่มีธาตุสังกะสี และเติมฟอสฟอสรัสเพิ่ม 1000 ppm (D_0 + Zn + P1)

กรรมวิธีที่ 9 ส้มปลอดโรคติดตาด้วยตาส้มปลอดโรค ให้สารละลายที่มีธาตุสังกะสี และเติมฟอสฟอสรัสเพิ่ม 2000 ppm (D_0 + Zn + P2)

กรรมวิธีที่ 10 ส้มปลอดโรคติดตาด้วยตาส้มที่เป็นโรคกรีนนิ่ง ให้สารละลายที่มีธาตุสังกะสี และไม่เติมฟอสฟอสรัสเพิ่ม (D_1 + Zn + P)

กรรมวิธีที่ 11 ส้มปลอดโรคติดตาด้วยตาส้มที่เป็นโรคกรีนนิ่ง ให้สารละลายที่มีธาตุสังกะสี และเติมฟอสฟอสรัสเพิ่ม 1000 ppm (D_1 + Zn + P1)

กรรมวิธีที่ 12 ส้มปลอดโรคติดตาด้วยตาส้มที่เป็นโรคกรีนนิ่ง ให้สารละลายที่มีธาตุสังกะสี และเติมฟอสฟอสรัสเพิ่ม 2000 ppm (D_1 + Zn + P2)

3.2.1 การเตรียมสารละลายธาตุอาหาร

เตรียม stock solutions เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 โดยการเตรียมสารละลายธาตุอาหารสำหรับส้มที่ปลูกในทราย ใช้ถังพลาสติกแบบมีฝาปิด ขนาด 30 แกลลอน (1 แกลลอน = 3.78 ลิตร ตามมาตรฐานอเมริกา หรือเท่ากับ 4.55 ลิตร ตามมาตรฐานอังกฤษ) จำนวน 2 ถัง แบ่งเป็นถังบรรจุสารละลายธาตุอาหารที่มีธาตุสังกะสี (+Zn) และถังบรรจุสารละลายที่ไม่มีธาตุสังกะสี (–Zn) เติมน้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สะอาดลงไป 100 ลิตร ตามด้วยสารละลายเข้มข้น A และ B ปริมาตรเท่ากัน วัด EC และปรับ pH ตามขั้นตอนที่ระบุในการทดลองที่ 1 ในถังมีปั๊มน้ำ (aquarium filter) กำลัง 70 วัตต์ (Jun® model : HX – 4500) จุ่มอยู่ และต่อเข้ากับท่อ PE (polyethylene pipe) ขนาด 16 มิลลิเมตร เพื่อปั๊มสารละลายส่งไปยังส้มแต่ละต้น

3.2.2 การปลูกส้มในทราย

การทดลองนี้ปลูกส้มโดยใช้ทรายเป็นวัสดุปลูก ส้มแต่ละต้นได้รับสารอาหารจากถังบรรจุสารละลายธาตุอาหารในลักษณะน้ำหยด สถานที่ทดลองใช้บริเวณเดียวกับงานทดลองที่ 1 เบื้องต้นออกแบบการจัดวางต้นส้มเป็นแถว ๆ ละ 14 ต้น จำนวน 6 แถว ระยะห่างระหว่างต้น 1 ฟุต ระหว่างแถว 80 เซนติเมตร ส้มจำนวน 3 แถว หรือ 42 ต้น จะได้รับสารละลายธาตุอาหารแบบ –Zn ที่เหลือได้รับสารอาหารแบบ +Zn โดยต่อท่อ PE ขนาด 16 มิลลิเมตร จากปั๊มน้ำในถัง แล้วต่อเข้ากับท่อ PVC (polyvinyl chloride pipe) ขนาด 4 หุน ความยาว 160 เซนติเมตร นำมาตัดครึ่งแล้วเชื่อมด้วยข้อต่อ 4 ทาง ขนาด 4 หุน ปิดปลายสองด้านของท่อด้วยข้องอขนาดเดียวกัน จากนั้นนำหางปลามาเสียบที่ข้อต่อแต่ละอัน ได้ท่อ PVC วางเป็นแนวหัวแถวสำหรับส้มจำนวน 3 แถว ถัดมาจึงนำท่อ PE ขนาดเดียวกับที่ใช้ต่อจากปั๊มน้ำ ความยาว 4.5 เมตร มาต่อเข้ากับหางปลา เจาะท่อด้วยที่เจาะท่อ PE ระยะห่าง 1 ฟุต จำนวน 14 รู ปิดรูด้วยอะแดบเตอร์ นำสายน้ำหยดสีดำ ยาว 50 เซนติเมตร มาเสียบต่อ ซึ่งปลายสายน้ำหยดจะมีขาปักน้ำหยดเสียบอยู่ ลักษณะเป็นแท่งพลาสติกปลายแหลมมีร่องสำหรับให้น้ำไหลเป็นหยดลงมาจากสายยาง ใช้เสียบลงบนทรายในถุงปลูก ส่วนปลายท่อ PE ที่เหลืออีกด้านหักพับเข้ามาและปิดปลายด้วยห่วงปิดปลายท่อ PE

สำหรับต้นส้มที่ใช้ทดลองเป็นส้มโชกุนปลอดโรค ที่ขยายพันธุ์ด้วยการติดตาบนต้นตออายุประมาณ 6 เดือน จำนวน 84 ต้น ในจำนวนนี้ส้ม 42 ต้น จะติดตาด้วยตาส้มโชกุนที่ปลอดโรคต้นละ 3 ตา ระยะห่างระหว่างตาประมาณ 5 เซนติเมตร ที่เหลืออีก 42 ต้น จะติดตาด้วยตาส้มโชกุนที่เป็นโรคกรีนนิ่งในลักษณะเดียวกัน หลังจากติดตาปลูกส้มไว้ในสภาพถุงปลูกเช่นเดิมประมาณ 1 เดือน เพื่อรอให้ตาผสานสนิทกับลำต้น จึงจะนำไปปลูกในทรายได้

การเตรียมทรายปลูก ใช้ทรายกรองน้ำ number 1 ขนาดประมาณ 1.32 – 1.86 มิลลิเมตร จาก บริษัท พิบูลย์ทราย จำกัด ทำความสะอาดทรายด้วยน้ำเปล่า แล้วแช่ด้วยกรดไนตริก 0.5% นาน 2 วัน เมื่อครบกำหนดนำทรายมาล้างด้วยน้ำจน pH ของทรายเหลือประมาณ 6 จึงนำทรายมากองผึ่งไว้ให้หมาดสำหรับปลูกส้มในขั้นตอนต่อไป

ก่อนปลูกตัดยอดส้มออกให้มีความสูงจากบริเวณรอยต่อระหว่างต้นตอกับตายอดประมาณ 1 ฟุต ล้างรากให้สะอาดแล้วปลูกลงในถุงปลูกต้นไม้สีขาว ซึ่งมีข้อดีคือสามารถมองเห็นระดับน้ำในถุงปลูกได้ จัดรากส้มให้แผ่ออกแล้วค่อย ๆ เติมทรายลงไปจนระดับทรายอยู่ห่างจากปากถุงประมาณ 1 นิ้ว ระวังอย่าให้รากโผล่พ้นผิวทราย กรณีที่รากยาวเกินไปสามารถใช้กรรไกรตัดกิ่งตัด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

รากทิ้งบางส่วน เพื่อให้รากจมอยู่ในทรายและมีความยาวพอดีกับขนาดถุง ขณะที่ถุงปลูกมักมีการเจาะรูไว้อยู่แล้ว ให้ใช้เทปปิดรูด้านล่างสุดจากข้างในถุงเพื่อป้องกันสารละลายไหลออก ตำแหน่งของรูถัดขึ้นไปควรสูงจากระดับก้นถุง 1 นิ้วเสมอหลังปลูกเสร็จ เนื่องจากตำแหน่งดังกล่าวจะเป็นทางออกของสารละลายธาตุอาหารกรณีที่มีการให้สารละลายมากเกินไป ส่วนตำแหน่งรูเจาะอื่นที่เหลือและอยู่สูงขึ้นไปไม่จำเป็นต้องปิดรูด้วยเทป นำถุงส้มที่ปลูกเสร็จแล้วไปวางตามตำแหน่งที่มีสายยางน้ำหยดและเสียบขาปักน้ำหยดบนทราย ต้นส้มกรรมวิธีที่ต้องเติมฟอสฟอรัสเพิ่มให้บดปุ๋ยทริเปิลซุปเปอร์ฟอสเฟตจนละเอียดแล้วละลายกับสารละลายธาตุอาหารเทราดบนทราย จากนั้นใช้แผ่นโฟมสี่เหลี่ยมปิดทับปากถุงปลูกป้องกันน้ำระเหยจากทรายและสิ่งสกปรก

ให้สารละลายธาตุอาหารกับต้นส้มวันละ 3 เวลา ได้แก่ 8.00 12.00 และ 16.00 นาฬิกา แต่ละครั้งใช้เวลานาน 30 วินาที โดยติดตั้งเครื่องปิดและเปิดสวิตซ์ (timer) เข้ากับปั๊มน้ำของถังสารละลายทั้งสอง เครื่อง timer จะควบคุมให้ปั้มปั้มสารละลายตามเวลาดังกล่าวโดยอัตโนมัติ ส้มแต่ละถุงจะได้รับสารละลายธาตุอาหารเฉลี่ย 238 มิลลิลิตรต่อวัน (10 ลิตร/42 ต้น/วัน) และควรรักษาระดับของสารละลายให้อยู่สูงจากก้นถุงประมาณ 1 นิ้ว ตลอดเวลา

ระหว่างการทดลองทำการเด็ดดอกหรือผลส้มทิ้งถ้ามี และหากมีการระบาดของแมลงศัตรูส้มให้พ่นสารเคมีตามความเหมาะสม

3.2.3 การบันทึกข้อมูล

สังเกตลักษณะอาการผิดปรกติที่เกิดขึ้นกับส้ม บันทึกความสูง วัดจากบริเวณรอยต่อของต้นตอกับตายอดขึ้นไป ขนาดทรงพุ่ม และค่าองศาของสีใบ เช่นเดียวกับงานทดลองที่ 1 โดยเพิ่มการวัดขนาดลำต้นของตายอดและต้นตอ โดยใช้ digital vernia วัดขนาดลำต้นเหนือรอยต่อขึ้นไป 5 เซนติเมตร และขนาดลำต้นที่อยู่ต่ำกว่ารอยต่อลงมา 5 เซนติเมตร นำตัวเลขที่ได้มาหารกันได้ค่าสัดส่วนของขนาดลำต้นระหว่างตายอดกับต้นตอ ถ้าค่าเข้าใกล้ 1 มากเท่าใด แสดงถึงความเข้ากันได้ดีระหว่างตายอดกับต้นตอ การวัดวัดขนาดใบ แบ่งออกเป็นขนาดความกว้างและความยาวของใบตำแหน่งที่ 3 นับจากยอด จำนวน 3 ใบต่อต้น เมื่อสิ้นสุดการทดลองจึงเก็บตัวอย่างใบมาวิเคราะห์หาปริมาณธาตุสังกะสี ตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในการทดลองที่ 1 และทำการซุ่มเก็บตัวอย่างใบเพื่อนำมาตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งจำนวน 22 ต้น โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการตรวจสอบดังนี้

3.2.4 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบส้ม (ดัดแปลงจาก Dellaporta, 1983)

เก็บตัวอย่างใบส้มมาล้างทำความสะอาดและซับให้แห้ง ตัดเอาเฉพาะส่วนของเส้นกลางใบชั่งให้ได้น้ำหนัก 0.5 กรัม หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ในโกร่งแช่เย็น เติม grinding buffer ลงไป 5 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้ในตู้เย็น 10 นาที นำออกมาบดให้ละเอียดจนเป็นของเหลว จากนั้นเทใส่ในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้ว centrifuge ด้วยความเร็ว 10,000 rpm อุณหภูมิ 4°C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5 นาที ของเหลวจะแยกชั้นเป็น 2 ส่วน ส่วนที่อยู่ก้นหลอดจะเป็นตะกอนสีเขียว และส่วนที่เป็นของเหลวใสด้านบน ใช้ micropipette ดูดเก็บไว้ใน eppendorf อันใหม่ นำไป centrifuge ที่ 14,000 rpm 4°C นาน 25 นาที แล้วจึงเทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งไป สังเกตก้นหลอดมีตะกอนสีเขียวติดอยู่ ขั้นตอนต่อมาเติม CTAB buffer ปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร เพื่อปลดปล่อย DNA จากเซลล์ เขย่าด้วย vortex ให้ตะกอนละลายในสารละลาย และนำไป incubate ใน heat block 60°C เป็นเวลา 30 นาที ระหว่างนี้หมั่นเขย่าหลอดทดลองทุก ๆ 5 – 10 นาที

หลังการ incubate จึงตกตะกอนโปรตีนด้วยการเติม chloroform/isoamyl alcohol 0.7 มิลลิลิตร centrifuge ด้วยความเร็ว 7,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที ของเหลวในหลอดทดลองจะแยกเป็น 2 ส่วน โดยด้านล่างเป็น chloroform/isoamyl alcohol ให้ดูดของเหลวด้านบนใส่ใน eppendorf อันใหม่ เติม isopropanol ลงไปเท่ากับปริมาตรของเหลวที่ดูดได้ จากนั้น centrifuge ที่ความเร็ว 14,000 rpm 4°C 15 นาที เทของเหลวส่วนบนทิ้งไป เคาะเบา ๆ บนกระดาษชำระเพื่อซับของเหลวส่วนเกินออก ได้ตะกอนของ DNA ติดอยู่ก้นหลอด ล้างตะกอนโดยเติม 70% ethanol alcohol 50 µl แล้ว centrifuge ที่ความเร็ว 5,000 rpm อุณหภูมิห้อง 5 นาที เทเอธานอลแอลกอฮอล์ทิ้ง นำ eppendorf ดังกล่าวไปใส่ใน microcentrifuge vacuum ประมาณ 15 – 30 นาที หรือจนกว่าตะกอนดีเอ็นเอจะแห้ง จึงเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 20 µl เพื่อเก็บตะกอน

3.2.5 การเพิ่มปริมาณ GO–DNA โดยเทคนิค PCR (ดัดแปลงจาก Sdoodee, 1999)

DNA ที่สกัดได้ในเบื้องต้นเป็น total DNA ซึ่งประกอบด้วย DNA ของพืชและของเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่ง (greening organisms; GO) ขั้นตอนนี้จึงเป็นการเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อสาเหตุให้มีปริมาณมากพอสำหรับตรวจสอบด้วยเทคนิค gel electrophoresis ในลำดับต่อไป โดยเริ่มจากการเตรียม mastermix (ภาคผนวก ก) แล้วแบ่งใส่หลอด PCR tube หลอดละ 24 µl จากนั้นจึงเติม DNA ที่สกัดได้ลงไปหลอดละ 1.0 µl ส่วน positive control เติม GO-DNA และ negative control ให้เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อลงไป 1.0 µl เช่นกัน หลังจากนั้นจึงย้าย PCR tube ไปใส่ใน thermocycler เพื่อให้เครื่องทำการเพิ่มปริมาณ DNA ตามโปรแกรมการทำงานที่ตั้งไว้ (ภาคผนวก ก)

3.2.6 การวิเคราะห์ GO–DNA โดยเทคนิค gel electrophoresis

ชั่ง agarose gel 0.3 กรัม ใส่ในขวดแก้วที่มีฝาปิด เติม 0.5xTBE buffer 30 มิลลิลิตร นำไปหลอมในตู้ไมโครเวฟให้เจลละลายจนกระทั่งได้สารละลายใส ตั้งขวดทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลง เทเจลที่ได้บน gel tray จากนั้นเสียบ comb ที่มีจำนวน well พอดีกับจำนวนตัวอย่างที่จะ load เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้วค่อย ๆ ดึง comb ออก ระวังอย่าให้ช่อง well ฉีกขาด ย้ายเจลที่ได้ไปใส่ใน electrophoresis gel tank และเติม 0.5xTBE buffer จนท่วมเหนือเจล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ดูด loading buffer 2 µl หยดบนแผ่นพาราฟิล์มเป็นจุด ๆ ห่างกันพอสมควร จากนั้นใช้ micropipette ดูด DNA ที่สกัดได้ 8 µl หยดบน loading buffer ดูดขึ้นลงให้สารผสมเข้ากัน แล้ว load บน agarose gel ที่เตรียมไว้ โดยกำหนดให้ well แรกเป็น DNA marker ถัดมาคือ positive และ negative control ตามลำดับ well ที่เหลือจึงเป็นตัวอย่างอื่นต่อไป เมื่อครบแล้วจึงปิดฝา gel tank ตั้งเครื่องที่ 50 volt เวลา 90 นาที ตัวอย่างที่ใส่ลงไปบนเจลจะเคลื่อนที่จากด้านที่เป็นตำแหน่ง well ลงมาด้านล่างของเจล

เมื่อเครื่องหยุดทำงาน ย้ายเจลที่ได้ไปใส่ในกล่องพลาสติกที่มีน้ำสะอาดเพื่อล้างเจล จากนั้นนำไปแช่ในสารละลาย ethidium bromide (ethidium bromide 1 mg/ml ผสมน้ำในอัตราส่วน 20 µl/dH_2O 1 l) ประมาณ 10 นาที ตักเจลออกมาล้างน้ำสะอาด เพื่อล้างเอาเอทธิเดียมโบรไมด์ออก ย้ายเจลที่ได้ไปใส่ในเครื่อง gel document ตัวอย่างที่มี DNA ของเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งจะปรากฏแถบ DNA ตำแหน่งเดียวกับ positive control ซึ่งมีขนาด DNA ประมาณ 1,160 bp เทียบกับ DNA marker

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved