บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นที่จะทราบถึงระดับไนโตรเจนในใบข้าวโพดที่สัมพันธ์กับปริมาณคลอโรฟิลล์ ระยะพัฒนาการการเจริญเติบโต และผลผลิตของข้าวโพดโดยพัฒนาจากดัชนีชี้วัดระดับความเข้มของของสีใบข้าวโพดที่วัดได้จากภาพถ่ายด้วยกล้องดิจิตอลโดยทำการทดลอง ณ บริเวณเรือนกระจก (UTM 47Q 495855 2078084) ศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ทำการศึกษาในช่วงเดือนมีนาคม–กรกฎาคม 2552 มีรายละเอียดในการทดลองดังนี้

ทำการปลูกข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 5 วันที่ 21 มีนาคม 2552 ในกระถางดินเผาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 16 นิ้ว โดยใช้วิธีปลูกแบบหยอดเมล็ด หยอดเมล็ดข้าวโพด 3 เมล็ดต่อกระถาง เมื่อข้าวโพดมีอายุ 7 วันหลังปลูกทำการถอนแยกข้าวโพดให้เหลือกระถางละ 1 ต้น วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomize Design จำนวน 2 ซ้ำ มีวิธีการดังนี้คือ

กำหนดให้ Treatment คือ อัตราปุ๋ยไนโตรเจนซึ่งในการทดลองนี้ใช้ปุ๋ยยูเรียระดับต่างๆ คือ

1. Control ไม่มีการใส่ปุ๋ย
2. ใส่ปุ๋ยยูเรียอัตรา 40 กิโลกรัมต่อไร่ (18.4 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่)
3. ใส่ปุ๋ยยูเรียอัตรา 80 กิโลกรัมต่อไร่ (36.8 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่)
4. ใส่ปุ๋ยยูเรียอัตรา 120 กิโลกรัมต่อไร่ (55.2 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่)
5. ใส่ปุ๋ยยูเรียอัตรา 160 กิโลกรัมต่อไร่ (73.6 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่)

โดยในแต่ละ Treatment นั้นทำการปลูกข้าวโพด 10 กระถาง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การดูแลรักษา

ในระหว่างการดำเนินการทดลองมีการให้น้ำในระดับที่เหมาะสมตลอดระยะเวลาการเพาะปลูกตั้งแต่ทำการหยอดเมล็ดจนถึงระยะติดฝัก การดูแลควบคุมและการป้องกันศัตรูพืชและกำจัดวัชพืชตามความเหมาะสม

วิธีการเก็บข้อมูล

วิธีการเก็บข้อมูลแบ่งออกเป็นสามส่วน โดยส่วนแรกเป็นข้อมูลด้านการพัฒนาการและการเจริญเติบโต ส่วนที่สองผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิต และส่วนที่สามเป็นข้อมูลพลวัตของความเข้มสีใบข้าวโพดที่วัดจากคลอโรฟิลล์มิเตอร์ (SPAD-502), Leaf Color Chart, ดัชนีความเข้มของสีใบ และค่าการดูดกลืนช่วงแสงของสารสกัดจากใบข้าวโพดด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer

การบันทึกข้อมูลพัฒนาการและการเจริญเติบโต

1. บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตโดยบันทึกหาน้ำหนักแห้งมวลชีวภาพตามระยะพัฒนาการที่กำหนดไว้ได้แก่ ระยะ V3, V5, V7, V9, V11, V13, V15, V17 และระยะสุกแก่ทางสรีระวิทยา โดยทำการสุ่มตัวอย่างข้าวโพดจำนวน 1 กระถาง ในแต่ระยะดังกล่าวข้างต้นแล้วนำตัวอย่างแยกออกเป็นส่วนๆ ประกอบด้วยลำต้นและใบ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักแห้งมวลชีวภาพตามระยะการเจริญเติบโต และทำการวิเคราะห์ข้อมูลการเจริญเติบโตทำโดยการนำข้อมูลน้ำหนักแห้งใบและต้นในแต่ละระยะมาสร้างสมการ 3rd order polynomial

จากสมการ $y = a+bx+cx^2+dx^3$ เมื่อ y = ค่าน้ำหนักแห้ง
a, b, c, d = ค่าสัมประสิทธิ์
x = จำนวนวันหลังปลูก

จากสมการดังกล่าวสามารถแทนค่า x คือจำนวนวันหลังปลูกตั้งแต่วันแรกที่ทำการหยอดเมล็ดจนถึงวันที่ข้าวโพดสุกแก่ทางสรีระวิทยาในสมการ เพื่อใช้หาค่า y ที่มีค่ามากที่สุดซึ่งจะเป็นค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดและสังเกตค่า x ที่ประเมินได้จะได้ค่าวันที่ปรากฏการสะสมน้ำหนักแห้งสูงสุด แล้วนำค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดและวันน้ำหนักแห้งสะสมสูงสุดที่ได้มาหาอัตราการสะสมน้ำหนักแห้งเฉลี่ย โดยใช้สมการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$$\text{อัตราการสะสมน้ำหนักแห้งเฉลี่ย} = \frac{\text{ค่าของน้ำหนักแห้งสูงสุด}}{\text{วันน้ำหนักแห้งสะสมสูงสุด}}$$

2. บันทึกความสูงของต้นข้าวโพดโดยวัดจากระดับผิวดินถึงปลายใบลำดับสูงสุดที่ระยะ V3, V5, V7, V9, V11, V13, V15, V17 และระยะสุกแก่ทางสรีระวิทยา

การบันทึกข้อมูลผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิต

1. ข้อมูลผลผลิตหาได้โดยเก็บตัวอย่างผลผลิตจากข้าวโพด 2 ต้น นำผลผลิตที่ได้มาชั่งน้ำหนักและทำการเฉลี่ยเพื่อหาน้ำหนักผลผลิตต่อ 1 ต้น

2. เก็บข้อมูลองค์ประกอบผลผลิต โดยทำการเก็บตัวอย่างจากข้าวโพด 1 กระถาง แล้วทำการบันทึก

- จำนวนฝัก/ต้น
- จำนวนแถวของเมล็ดข้าวโพด/ฝัก
- จำนวนเมล็ด/ฝัก
- น้ำหนัก 100 เมล็ด

3. คำนวณค่าดัชนีเก็บเกี่ยว (Harvest index: HI) จากสมการ

HI = นน.เมล็ด/นน.แห้งส่วนเหนือดินทั้งหมด

การบันทึกข้อมูลพลวัตของความเข้มของสีใบข้าวโพด

1. ทำการศึกษาความเข้มของสีใบข้าวโพดในใบยอด (ใบอ่อนที่คลี่เต็มที่แล้ว: Y-leave) ที่ระยะ V3, V5, V7, V9, V11, V13, V15 และ V17 ของทุก Treatment โดยการใช้คลอโรฟิลล์มิเตอร์ (SPAD-502) (ภาพที่ 10) ทำการวัดความเข้มของสีใบ 10 ตำแหน่งของใบข้าวโพด คือส่วนซ้ายของใบ 5 ตำแหน่งและส่วนขวาของใบ 5 ตำแหน่ง แล้วนำค่าทั้งหมดมาหาค่า SPAD (SCMR) เฉลี่ยของใบข้าวโพด

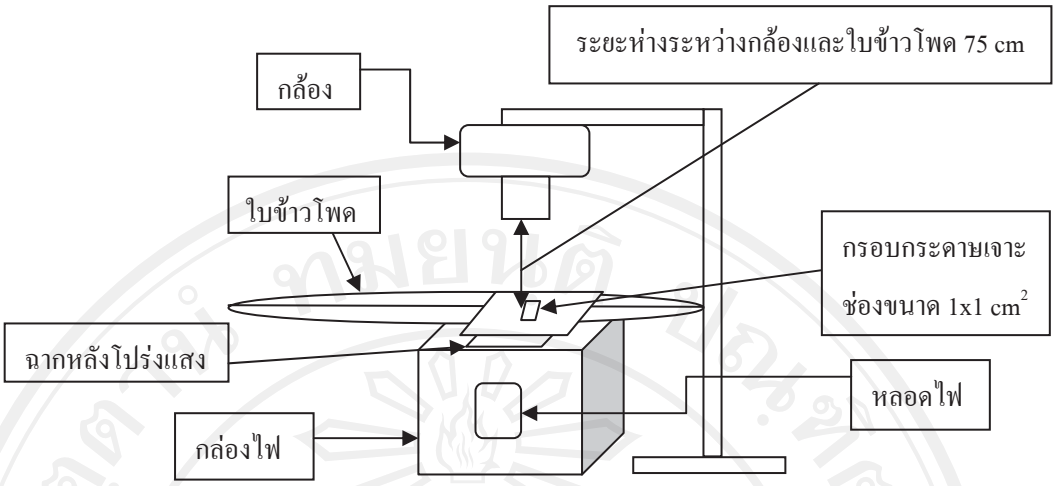
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 10 แสดงเครื่องมือคลอโรฟิลล์มิเตอร์ (SPAD-502) และลักษณะการใช้งาน

2. ประเมินระดับสีของใบข้าวโพดโดยนำใบข้าวโพดที่ระยะ V3, V5, V7, V9, V11, V13, V15 และ V17 การถ่ายภาพด้วยกล้องดิจิตอล SLR SONY α 200 ใช้เลนส์ Sigma Macro 100 mm. (ภาพที่ 11) ทำการถ่ายภาพโดยนำตัวอย่างใบข้าวโพดประกบด้วยกรอบขนาด 1 ตารางเซนติเมตร ระยะห่างระหว่างกล้องและใบข้าวโพดสูง 75 เซนติเมตร ตั้งค่ากล้องโดยปรับ shutter speed 1/60, iso 200 และ F 5.6 ใช้ฉากหลังเป็นกล่องไฟที่ประกอบด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนส์ แบบตะเกียบ ชนิด day light ขนาด 8 วัตต์ เพื่อเป็นการลดความแปรปรวนของแสงไฟ ทำการถ่ายภาพทั้งส่วนซ้ายและขวาของใบข้าวโพด ส่วนละ 3 จุดต่อใบ หลังจากนั้นนำภาพที่ได้มาทำการแยกค่าสีโดยใช้โปรแกรม Adobe Photoshop CS4 แล้วนำค่าสีที่ได้มาคำนวณดัชนีของสีแดง (R) สีเขียว (G) และสีน้ำเงิน (B) โดยใช้การคำนวณดัชนีความเข้มสีใบข้าวโพดที่ดัดแปลงจาก Pagola *et al.* (2008) คือ

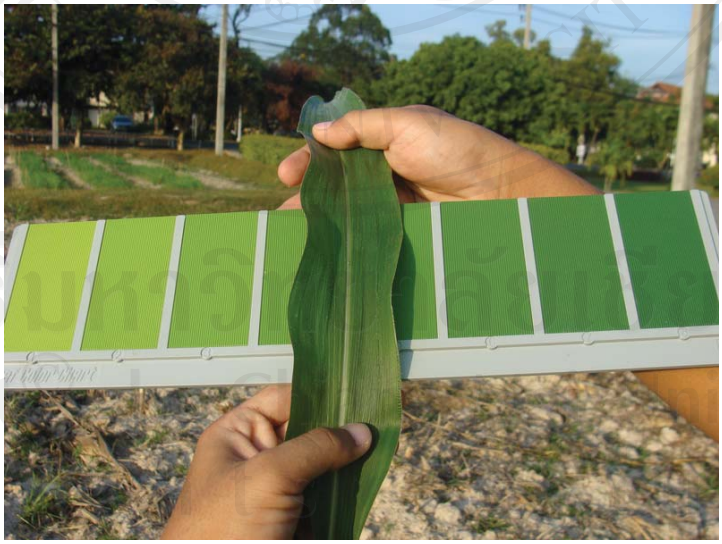
$$\text{ดัชนีความเข้มของสีใบข้าวโพด} = \left(\frac{1}{(0.7582|R - B| - 0.1168|R - G| + 0.6414|G - B|)} \right) \times 1000$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 11 แสดงวิธีการถ่ายภาพใบข้าวโพด

3. ประเมินค่าสีของใบข้าวโพดโดยใช้ Leaf Color Chart (ภาพที่ 12) พัฒนาโดย University of California Cooperative Extension (UCCE) ที่ระยะ V3, V5, V7, V9, V11, V13, V15 และ V17 ในแต่ทุก Treatment นำตัวอย่างใบข้าวโพดมาเปรียบเทียบลักษณะสีกับ Leaf Color Chart ซึ่งจะมีความแตกต่างกันของระดับสี และจะทำการบันทึกข้อมูลของระดับสีที่ใกล้เคียงกันที่สุด



ภาพที่ 12 แสดงอุปกรณ์ Leaf Color Chart และลักษณะการใช้งาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. ทำการศึกษาค่าการดูดกลืนช่วงแสงของสารสกัดจากใบข้าวโพดด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer ที่ระยะ V3, V5, V7, V9, V11, V13, V15 และ V17 ทำการทดลอง 2 ซ้ำต่อ treatment โดยใช้ใบที่คลี่ขยายเต็มที่ (youngest fully expanded leaf) ตัดตัวอย่างใบพืชจากแปลงเก็บไว้ในถุงพลาสติกและแช่ในถังน้ำแข็งที่ปิดสนิท แล้วรีบนำไปสกัด chlorophyll ในห้องปฏิบัติการทันที โดยใช้กรรไกรหั่นใบข้าวโพดให้มีขนาดเล็กจากนั้นนำตัวอย่างที่หั่นแล้วไปบดในโกร่งให้ละเอียด ชั่งน้ำหนักตัวอย่างใบที่บดละเอียดแล้ว 0.5 กรัม แช่ในสาร methanol 10 ml. เพื่อสกัดคลอโรฟิลล์ ระหว่างแช่ตัวอย่างใบในสารละลายคอยเขย่าหลอดทดลองเป็นระยะๆ เป็นเวลาประมาณ 30 นาที จะสังเกตได้ว่าตัวอย่างใบข้าวโพดเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน ซึ่งแสดงว่า chlorophyll ถูกสกัดออกหมดแล้ว ให้ดูดสารละลายสีเขียวที่สกัดได้ 1 ml. เจือจางกับ methanol จนสารละลายมีปริมาตร 10 ml. แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนช่วงแสงด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer ที่ช่วงแสง 663 nm ขั้นตอนทั้งหมดนี้ทำการวิเคราะห์ ณ ห้องปฏิบัติการทดลองภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยวิธี Analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละกรรมวิธีโดยวิธีหาค่า LSD (Least Significant Difference) นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์โดยวิธีการวิเคราะห์จากสมการ Regression analysis และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ Correlation analysis

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved