บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการที่ใช้ในการทดลอง

1. พืชทดลอง

ต้นกาแฟอราบิก้า สายพันธุ์คาติมอร์ ลูกผสมชั่วที่ 6 เบอร์ 5-4 2776 ปลูกเป็นแถวคู่บนแนวระดับ(contour line) ระยะปลูก 2x2 เมตร ขนาดหลุมปลูก 80x80x80 เซนติเมตร ทำการย้ายปลูกในเดือนสิงหาคม 2531 จำนวน 192 ต้น ขณะทำการทดลองต้นกาแฟมีอายุประมาณ 3 ปี

กาแฟอราบิก้า สายพันธุ์คาติมอร์ เป็นกาแฟลูกผสม ระหว่างพันธุ์เรดแคททูรา (Red Catura)และพันธุ์ ไฮบริโด เดอทิมอร์ (Hybrido de Timor) ซึ่งเป็นพันธุ์ที่สามารถต้านทานโรคราสนิมได้ดี และให้ผลผลิตสูง(Op de Laak, 1988)

2. สภาพการทดลอง

ต้นกาแฟในแปลงปลูกเป็นกาแฟที่ให้ผลผลิตแล้ว ก่อนทำการพรางแสง เด็ดผลอ่อนของกาแฟที่มีอยู่บนต้นทิ้งทั้งหมด สร้างโรงเรือนเพื่อพรางแสงแก่ต้นกาแฟในแต่ละหน่วยการทดลอง (experimental unit) ด้วยตาข่ายพลาสติกพรางแสงที่สามารถพรางแสงได้ 30 50 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยใช้หน่วยการทดลองที่ไม่ได้พรางแสงเป็นแปลงเปรียบเทียบ

สำหรับโรงเรือนพรางแสง มีขนาดความกว้าง 4 เมตร ยาว 12 เมตร สูง 2 เมตร ด้านทั้งห้าของโรงเรือนติดตาข่ายพรางแสงตามกรรมวิธีการทดลองในแต่ละกรรมวิธี ให้แต่ละด้านของโรงเรือนห่างจากต้นกาแฟประมาณ 1 เมตร

วางแผนการทดลองแบบ สุ่มบล็อกสมบูรณ์ มี 4 ซ้ำ มีกรรมวิธีการทดลอง ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 = ไม่ได้รับสภาพร่มเงา (ไม่พรางแสง)

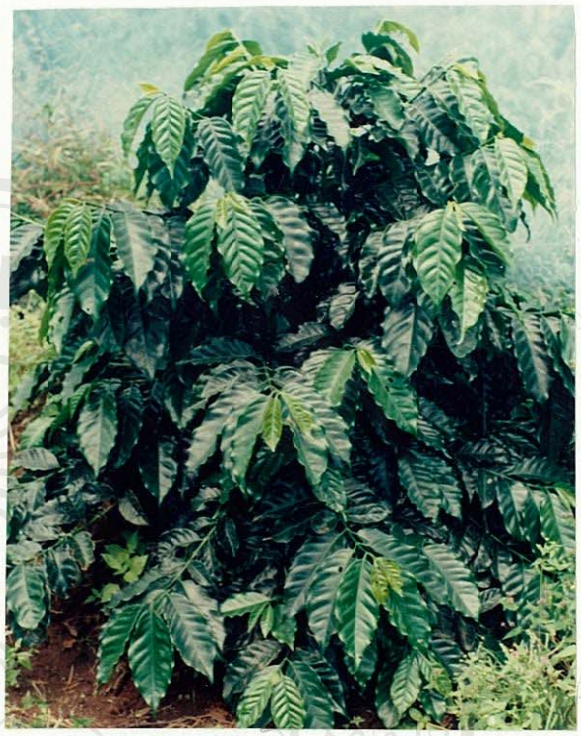
กรรมวิธีที่ 2 = ร่มเงาต่ำ (พรางแสง 30 เปอร์เซ็นต์)

กรรมวิธีที่ 3 = ร่มเงาปานกลาง (พรางแสง 50 เปอร์เซ็นต์)

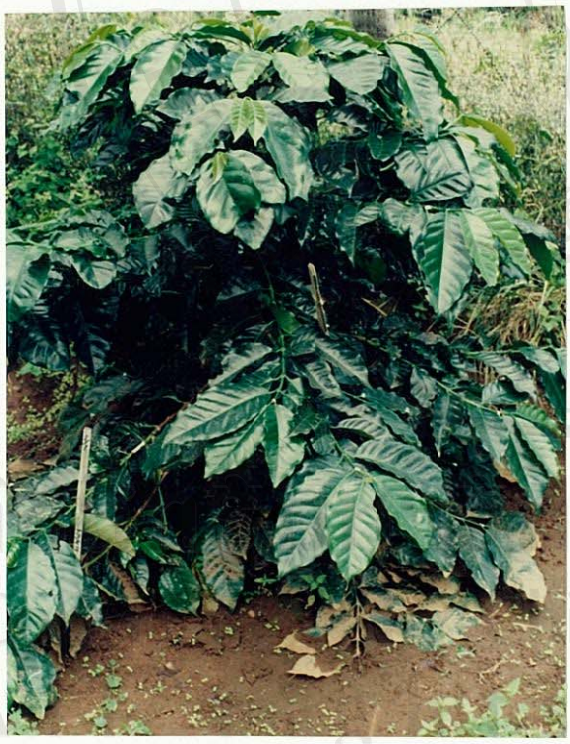
กรรมวิธีที่ 4 = ร่มเงาสูง (พรางแสง 75 เปอร์เซ็นต์)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สภาพแปลงทดลองที่ไม่ได้รับร่มเงา(0%)



สภาพแปลงทดลองที่ได้รับร่มเงาต่ำ(30%)



สภาพแปลงทดลองที่ได้รับร่มเงาปานกลาง(50%)

สภาพแปลงทดลองที่ได้รับร่มเงาสูง(75%)

รูปที่ 1 สภาพแปลงทดลองที่ได้รับสภาพร่มเงาระดับต่าง ๆ

3. เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

1) เครื่องวัดความเข้มแสง (Photometer Li-Cor, inc; LI -188 B)

รูปที่ 2 เครื่องวัดความเข้มแสง (Photometer Li-Cor, inc; LI -188 B)

เป็นเครื่องมือสำหรับวัดความเข้มแสง ประกอบด้วยส่วนประกอบสำคัญ 2 ส่วน คือ ส่วนตัวเครื่อง และส่วนสำหรับรับแสง

วิธีการวัดทำได้โดย ต่อส่วนรับแสงเข้ากับตัวเครื่อง เปิดสวิทช์และปรับปุ่มสภาพการวัดไปอยู่ที่ตำแหน่ง air ตั้งเวลาในการวัดเป็น 1 วินาที วางส่วนสำหรับรับแสงไว้ในแนวดิ่งค่าที่อ่านได้จากหน้าปัทม์ของเครื่อง คือค่าความเข้มแสงในขณะนั้น มีหน่วยเป็น $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$.

2) เครื่องวัดความชื้นสัมพัทธ์(Assmann's psychrometer)

เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ(Relative humidity)ประกอบด้วยเทอรโมมิเตอร์กระเปาะแห้ง และกระเปาะเปียกที่ถูกยึดไว้ด้วยกัน

วิธีการวัดทำได้โดย แขวน Assmann's psychrometer ไว้ในแนวดิ่งสูงจากพื้นดิน 1 เมตร อ่านค่าอุณหภูมิของกระเปาะแห้งและกระเปาะเปียก นำผลต่างระหว่างอุณหภูมิของกระเปาะทั้งสองมาเปรียบเทียบกับตารางมาตรฐาน(Aspiration psychrometer's table)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค่าที่ได้จากตารางมาตรฐานเป็นค่าความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ ส่วนอุณหภูมิที่อ่านจากกระเปาะแห้งถือเป็นอุณหภูมิอากาศในขณะนั้น

3) เครื่องเจาะดิน (Soil Core)

ใช้เป็นเครื่องมือสำหรับเจาะดินเพื่อเก็บตัวอย่างดินในระดับความลึกที่ต้องการในที่นี้ใช้เก็บตัวอย่างดินที่ระดับความลึก 0-15 เซนติเมตร

4) ตู้อบดินและตู้อบตัวอย่างพืช

เป็นตู้อบที่สามารถปรับอุณหภูมิได้ตามต้องการ เพื่อใช้อบดินชื้นที่เก็บจากในแปลงปลูกจนแห้งสนิท เพื่อใช้คำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้นของดิน โดยใช้อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง (พัฒนพันธุ์, 2532)

ใช้ในการอบตัวอย่างพืช โดยใช้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (AOAC, 1975)

4) เครื่องวัดพื้นที่ใบ (Area meter ,Delta-T Area Meter)

รูปที่ 3 เครื่องวัดพื้นที่ใบ (Area meter ,Delta-T Area Meter)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นเครื่องมือสำหรับวัดพื้นที่ใบพืช มีส่วนประกอบที่สำคัญ 4 ส่วน คือ กล่องรับแสง ตัวเครื่อง จอ และ กล้องถ่ายภาพ

วิธีการวัดทำได้โดย วางใบพืชที่ต้องการทราบพื้นที่ใบลงบนกล่องรับแสง ในขั้นตอนนี้จะต้องระมัดระวังไม่ให้ส่วนของใบซ้อนทับกัน ขนาดและภาพของใบที่วางเรียงบนกล่องรับแสง จะไปปรากฏบนจอ ซึ่งส่วนบนของจอจะบอกขนาดของพื้นที่ใบพืชที่วางอยู่บนกล่องรับแสงในขณะนั้น การวัดพื้นที่ใบด้วยเครื่องนี้ จะมีหน่วยเป็นตารางเซนติเมตร

6) เครื่องวัดค่าความต้านทานของปากใบ(Automatic Porometer,MK3 Delta-T Devices)

รูปที่ 4 เครื่องวัดค่าความต้านทานของปากใบ(Automatic Porometer,MK3 Delta-T Devices)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นเครื่องมือใช้วัด ค่าความต้านทานของปากใบ มีส่วนประกอบที่สำคัญอยู่ 2 ส่วน คือ ส่วนที่ใช้จับใบพืช และตัวเครื่อง ก่อนที่จะนำเครื่องไปวัดกับใบพืชจะต้องมีการวัดค่านับ(Count) จากแผ่นคาลิเบรชั่น (Calibration plate) ก่อน บนแผ่นคาลิเบรชั่นประกอบด้วยช่องพรุนขนาดต่าง ๆ กัน จำนวน 6 ช่อง เรียงกระจายอยู่ ซึ่งช่องแต่ละขนาดจะมีค่าความต้านทาน

ที่แตกต่างกัน ค่าความต้านทานของแผ่นคาลิเบรชั่นมีดังนี้ คือ

ช่องที่	1	2	3	4	5	6
Resistance (s/cm) ที่ 20 °ซ	22.50	10.90	6.50	2.90	1.30	0.40
Resistance (s/cm) ที่ 25 °ซ	21.83	10.57	6.31	2.81	2.26	0.39
Resistance (s/cm) ที่ 30 °ซ	21.15	10.25	6.11	2.73	2.22	0.38

จากนั้นหาสมการเส้นตรง $Y = a + bx$ ของกราฟคาลิเบรชั่น (Calibration graph) ระหว่างค่าความต้านทานของช่องพรุนกับค่านับ

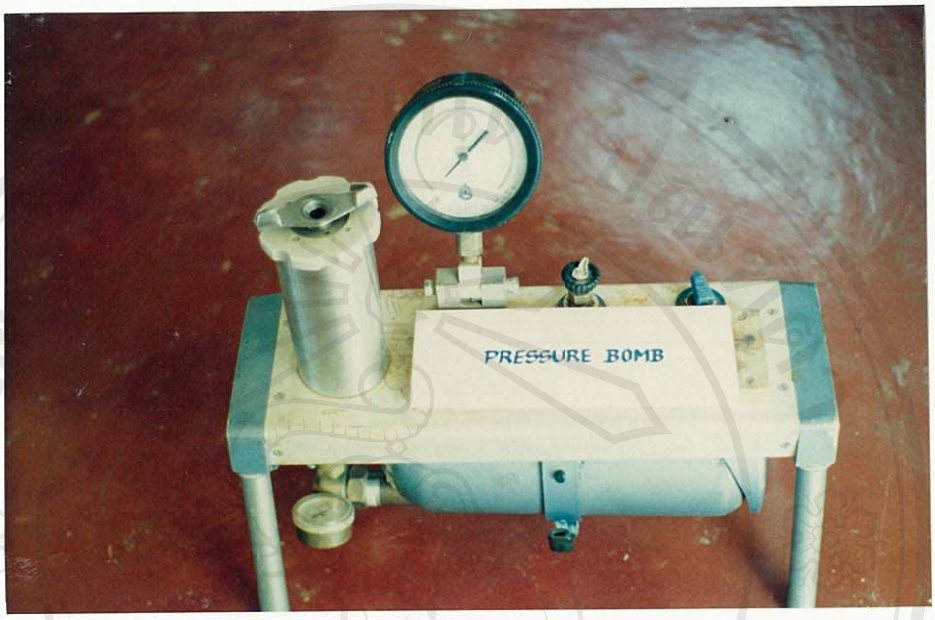
เมื่อทำการวัดค่านับจากใบพืช ซึ่งใช้หลักการตรวจวัดระยะเวลาที่ใช้สำหรับการระเหยของน้ำจากใบพืชผ่านทางปากใบออกมายังอากาศแห้งในตัวจับใบ จนอากาศแห้งมีความชื้นถึงจุดที่กำหนด ระยะเวลาที่ใช้จะเป็นสัดส่วนผกผันกับขนาดของรูของปากใบบนใบพืช

ค่านับที่ได้จากการวัดบนใบกาแฟ สามารถนำมาแปรค่าออกมาเป็นค่าความต้านทานของปากใบ (Stomatal reristance, r_s) ซึ่งใช้คำนวณค่าการเปิดปากใบ (Stomatal conductance, g_s) โดยใช้สมการ

Stomatal conductance = 1/Stomatal resistance (cm/s)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7) เครื่องวัดค่าศักย์ของน้ำในใบ (Pressure bomb)



รูปที่ 5 เครื่องวัดค่าศักย์ของน้ำในใบ (Pressure bomb)

เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดค่าศักย์ของน้ำภายในใบพืช (Leaf water potential, ψ_l) ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วน คือ กระบอกความดัน(Pressure chamber) เป็นส่วนที่ทนแรงดันก๊าซได้ดี ในส่วนนี้จะมีหน้าปัทม์บอกระดับความดันภายในกระบอก มีหน่วยเป็นบาร์(bar) และส่วนถังบรรจุก๊าซไนโตรเจน

วิธีการวัดทำได้โดยตัดใบพืชที่ต้องการวัดค่าศักย์ของน้ำในใบ ใส่ลงในกระบอกความดัน ให้ส่วนของก้านใบโผล่ออกทางช่องของฝาปิดที่ปิดสนิท ปล่อยก๊าซไนโตรเจนจากถังเข้าไปในกระบอกความดันอย่างช้าๆ เมื่อแรงดันในกระบอกมีมากพอจะทำให้น้ำในใบพืช(sap) ไหลออกทางก้านใบจนสามารถมองเห็นได้ที่บริเวณรอยตัดของก้านใบบนช่องของฝาปิดกระบอกความดัน ปริมาณความดันของก๊าซไนโตรเจนที่จุดนี้ถือเป็นจุดของค่าศักย์ของน้ำในใบพืช โดยอ่านค่าความดันก๊าซในกระบอกความดันจากหน้าปัทม์บอกความดัน หลังจากทราบค่าความดันแล้ว จึงปิดวาล์วของถังก๊าซไนโตรเจนพร้อมทั้งระบายก๊าซที่ค้างอยู่ในกระบอกความดันออก และเริ่มต้นวัดใบใหม่ตามวิธีการข้างต้นได้ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8) เครื่องวัดการดูดกลืนแสง(Spectrophotometer)

รูปที่ 6 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง(Spectrophotometer)

เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงในชั้นสารละลายของอซีโตน เพื่อใช้คำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์

วิธีการวัดทำได้โดย นำสารละลายซึ่งได้จากการบดใบพืชที่กรองเอาเศษพืชออกแล้วที่ละลายด้วยอซีโตน 85 เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงในหลอดแก้วไปอ่านค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 645 นาโนเมตร (nm.) นำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์รวมโดยใช้สมการดังนี้

$$\text{คลอโรฟิลล์ รวม} = \left[\frac{D_{645} \times 1000}{34.5} \right] \times \left[\frac{V}{1000} \times W \right]$$

D_{645} คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 645 นาโนเมตร(nm.)

V คือ ปริมาตรของอซีโตน 85 เปอร์เซ็นต์ ที่ใช้สกัดคลอโรฟิลล์

W คือ น้ำหนักใบกาแฟสดที่ใช้สกัดคลอโรฟิลล์

9) เครื่องชั่งน้ำหนัก

เป็นเครื่องมือใช้สำหรับชั่งน้ำหนักใบกาแฟสด เพื่อใช้เตรียมตัวอย่างพืชหาปริมาณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คลอโรฟิลล์ และสำหรับชั่งน้ำหนักแห้งของตัวอย่างพืช เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรต และใช้ชั่งน้ำหนักดินชื้นและน้ำหนักดินอบแห้งสนิท เพื่อใช้คำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้นภายในดิน

10) อุปกรณ์และเครื่องแก้วสำหรับสกัดคลอโรฟิลล์และวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรต

เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดคลอโรฟิลล์ตามวิธีของ Whitham et al (1971) และวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธี Shaffer-Somogyi Copper Iodometric Titration(AOAC, 1975) ได้แก่เครื่องแก้วที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป เช่น

1. โกร่ง กระเบื้องเคลือบ
2. บีกเกอร์ ขนาด 100 และ 2,000 มิลลิลิตร
3. ขวดปริมาตร ขนาด 50 และ 250 มิลลิลิตร
4. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร
5. หลอดแก้ว ขนาด 25 x 200 มม.
6. บูเรตต์ ขนาด 25 มิลลิลิตร
7. กระบอกตวง ขนาด 10 และ 100 มิลลิลิตร
8. ไปเปต ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร

11) สารเคมี

สารเคมีที่ใช้สำหรับสกัดคลอโรฟิลล์ ตามวิธีของ Whitham et al(1971) และวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตที่ดัดแปลงจากวิธี Shaffer-Somogyi Copper Iodometric Titration (AOAC, 1975) มีดังนี้

1. Acetone 85%
2. Sodium carbonate
3. Potassium sodium tartrate
4. Copper sulfate
5. Sodium bicarbonate
6. Potassium iodide

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

7. Potassium iodate
8. Potassium oxalate
9. Mercuric iodide
10. Sodium thiosulfate
11. Chromic acid
12. Potassium dichromate
13. Ethanol
14. Sodium hydroxide
15. Iodide-oxalate
16. Sulfuric acid

4. วิธีการที่ใช้ในการทดลอง

1. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมต่างๆ ของแปลงปลูกเมื่อให้ร่มเงา

1.1 บันทึกความเข้มแสง

ทำการวัดความเข้มแสงในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง โดยวางส่วนรับแสงของเครื่องไว้ในแนวดิ่ง บริเวณกลางแปลงทดลอง ปรับเวลาในการรับแสงเป็น 1 วินาที ค่าที่ได้จะเป็นความเข้มแสงในขณะนั้น ทำการตรวจวัดจุดละ 5 ค่า เพื่อนำมาหาค่าเฉลี่ยในแต่ละครั้ง เก็บข้อมูลเดือนละครั้งๆ ละ 5 เวลา คือ 08.00 10.00 12.00 14.00 และ 16.00 น.

1.2 บันทึกข้อมูลอุตุนิยมวิทยาการเกษตร

- อุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์นอกร่มเงา
- อุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์ภายใต้สภาพร่มเงาแต่ละระดับ

การบันทึกข้อมูลอุตุนิยมวิทยาการเกษตร สามารถกระทำได้โดยการติดตั้งเครื่องวัดความชื้นสัมพัทธ์สูงจากระดับพื้นดิน 1 เมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง ความชื้นสัมพัทธ์ทั้งภายใน และภายนอกร่มเงา ใช้ผลต่างของอุณหภูมิกระเปาะแห้ง และกระเปาะเปียกเปรียบเทียบกับค่าตารางมาตรฐาน ส่วนอุณหภูมิใช้ระดับอุณหภูมิของกระเปาะแห้ง บันทึกข้อมูลเดือนละครั้ง ๆ ละ 5 เวลา คือ 08.00 10.00 12.00 14.00 และ 16.00 น. นำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยเป็นตัวแทนของระดับอุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์ในแต่ละเดือน

1.3 บันทึกการเปลี่ยนแปลงระดับความชื้นในดิน

เป็นการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของระดับความชื้นในแปลงปลูกกาแฟแต่ละหน่วยการทดลอง โดยการใช้เครื่องเจาะดินเจาะดินลงไปบริเวณกลางแปลงทดลองในแต่ละกรรมวิธี ที่ระดับความลึก 0–15 เซนติเมตร นำดินที่เจาะได้ใส่ในถุงพลาสติกมัดปากถุงให้แน่น ชั่งน้ำหนักดินชื้นก่อนนำไปอบแห้งในตู้อบดินที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำดินที่แห้งสนิทชั่งอีกครั้งเพื่อนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้นในดินโดยใช้สูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้นในดิน} = \frac{\text{น้ำหนักดินชื้น} - \text{น้ำหนักดินแห้งสนิท}}{\text{น้ำหนักดินแห้งสนิท}} \times 100$$

2. ศึกษาการเจริญเติบโตของกาแฟภายใต้สภาพร่มเงา

โดยสุ่มต้นกาแฟในแต่ละระดับร่มเงา ระดับละ 3 ต้น ศึกษาการเจริญเติบโตทุกเดือน ๆ ละครั้ง แล้วบันทึกข้อมูลต่าง ๆ ดังนี้

2.1 นับจำนวนใบต่อต้น

2.2 วัดความสูงของต้น

2.3 วัดความยาวกิ่งให้ผล

2.4 นับจำนวนข้อทั้งต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5 วัดพื้นที่ใบ

สุ่มต้นกาแฟในแต่ละระดับร่มเงาระดับละ 1 ต้น เก็บใบคู่ที่ 4 และ 5 จากปลายกิ่งที่อยู่บริเวณกลางทรงพุ่ม เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของขนาดใบเมื่อได้รับสภาพร่มเงาในระดับต่าง ๆ นำใบที่เก็บมาเรียงบนกล่องรับแสง ของเครื่องวัดพื้นที่ใบ บันทึกพื้นที่ใบที่ปรากฏบนจอ และจำนวนใบในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง

3. ศึกษาศักยภาพการให้ผลผลิตภายใต้สภาพร่มเงา

โดยสุ่มต้นกาแฟในแต่ละระดับร่มเงา ระดับละ 3 ต้น ศึกษาศักยภาพการให้ผลผลิตทุกเดือน ๆ ละครั้ง และบันทึกข้อมูลต่าง ๆ ดังนี้

3.1 นับจำนวนกิ่งให้ผลผลิต

3.2 นับจำนวนดอกต่อกิ่ง

3.3 นับจำนวนผลต่อกิ่ง

3.4 เปอร์เซ็นต์การติดผล

4. ศึกษาพฤติกรรมการตอบสนองทางสรีรวิทยาของกาแฟเมื่ออยู่ใต้สภาพร่มเงา

4.1 พฤติกรรมการตอบสนองของปากใบ และค่าศักย์ของน้ำในใบกาแฟที่ได้รับสภาพร่มเงาระดับต่าง ๆ

การทดลองนี้เพื่อเป็นการศึกษาพฤติกรรมการตอบสนองของปากใบกาแฟ และค่าศักย์ของน้ำในใบกาแฟว่ามีความเปลี่ยนแปลงอย่างไรเมื่อมีการให้ร่มเงาในระดับที่แตกต่างกัน โดยใช้อุปกรณ์ดังนี้

1. เครื่องมือวัดค่าความต้านทานของปากใบ (Automatic Porometer MK-3 Delta-T Devices)
2. เครื่องมือวัดค่าศักย์ของน้ำภายในใบพืช (Pressure bomb)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ทำการทดลองกับต้นกาแฟในแปลงปลูก ในหน่วยการทดลองที่ไม่มีการพรางแสงและที่พรางแสงทั้ง 3 ระดับ คือ 30 50 และ 75 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยก่อนวัดค่าความต้านทานปากใบจะต้องวัดค่าความต้านทานของแผ่นคาลิเบรชั่นก่อน จึงจะทำการวัดค่าความต้านทานของปากใบกาแฟในแปลงทดลองแต่ละระดับร่มเงา จากต้นที่สุ่มไว้วัดการเจริญเติบโตต้นละ 2 กิ่ง วัดจากใบคู่ที่ 4 หรือ 5 จากปลายกิ่ง ส่วนการวัดค่าศักย์ของน้ำในใบทำการวัดจากต้นที่สุ่มไว้สำหรับใช้วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของปริมาณคาร์โบไฮเดรต โดยการศึกษาในใบกาแฟคู่ที่ 4 หรือ 5 จากปลายกิ่งเช่นเดียวกัน และวัดค่าต่างๆ ดังกล่าวเดือนละครั้ง ๆ 5 เวลาคือ 8.00 10.00 12.00 14.00 และ 16.00 น. ตามลำดับ

4.2 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบกาแฟ เมื่อปลูกภายใต้สภาพร่มเงา

เป็นการศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบกาแฟคู่ที่ 4 หรือ 5 จากปลายกิ่ง ตามรายงานของ Bould et al(1971) กล่าวว่า ในประเทศเคนยาแนะนำให้ใช้ใบกาแฟคู่ที่ 4 หรือ 5 จากปลายกิ่ง ซึ่งเป็นคู่ใบที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้วและเหมาะสมที่ใช้ในการหาระดับธาตุอาหาร การสกัดคลอโรฟิลล์ในใบกาแฟใช้วิธีการของ Whitham et al(1971) โดยมีอุปกรณ์และวิธีการดังนี้

นำเนื้อเยื่อจากใบกาแฟสดหนัก 0.5 กรัม ซอยเป็นฝอยเพื่อให้สะดวกในการบด เติมอซีโตน 85 เปอร์เซ็นต์ลงไปในขณะบดด้วยโกร่งเคลือบ หลังจากบดจนละเอียดแล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เพื่อแยกเอาเศษใบพืชออกจากสารละลาย ล้างกระดาษกรองอีกครั้งด้วยอซีโตน 85 เปอร์เซ็นต์ จะได้สารละลายสีเขียวเข้ม เจือจางสารละลายอีกครั้งจนได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แบ่งสารละลายที่เจือจางแล้วใส่ลงในหลอดแก้วเพื่อนำไปวัดค่าการดูด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

กลืนแสง ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 645 นาโนเมตร (nm.) นำค่าที่อ่านได้ไปคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์รวม

4.3 ศึกษาปริมาณคาร์โบไฮเดรตสะสมในกิ่งที่ให้ผลผลิต

เป็นการศึกษาปริมาณคาร์โบไฮเดรตในกิ่งกาแฟ โดยใช้กิ่งกาแฟที่สุ่มจากบริเวณกลางทรงพุ่ม จากต้นกาแฟที่สุ่มไว้ศึกษาค่าศักย์ของทั้งในใบ เดือนละต้น ๆ ละ 2 กิ่ง การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต ใช้วิธี Shaffer-Somogyi Copper Iodometric Titration (AOAC, 1975) เพื่อให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณคาร์โบไฮเดรตในกิ่งกาแฟ ภายหลังจากได้รับสภาพร่มเงาระดับต่าง ๆ โดยมีอุปกรณ์และวิธีการวิเคราะห์ ดังนี้

4.3.1. การเตรียมสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต

1. Shaffer-Somogyi-Carbonate 50 reagent

ละลาย sodium carbonate และ potassium sodiumtatrate ชนิดละ 25 กรัม กับน้ำกลั่น 200 ml. ในบีกเกอร์ขนาด 2 ลิตร เติมสารละลาย copper sulfate 10 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 75 ml. โดยในขณะเติมให้ปลายกรวยอยู่ใต้ผิวของสาละลาย เติม sodium bicarbonate 20 กรัม ทำให้ละลายแล้วเติม potassium iodide 5 กรัม เทสารละลายทั้งหมดลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร เติม potassium iodate 0.100 N (3.567 กรัม potassium iodate ในน้ำ 1 ลิตร) จำนวน 250 ml. ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร กรองและเก็บไว้หนึ่งคืนก่อนนำไปใช้

2. Starch indicator

ผสม soluble starch 2.5 กรัม กับ mercuric iodide 10 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นปริมาณเล็กน้อยคนให้เข้ากัน แล้วนำไปละลายในน้ำกลั่นที่กำลังเดือด 500 ml. ปล่อยทิ้งไว้นาน 1 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นลงช้า ๆ แล้วนำเก็บไว้ในตู้เย็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3. Iodide-oxalate solution

ละลาย potassium iodide และ potassium oxalate ชนิดละ 2.5 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 ml.(น้ำยานี้ต้องเตรียมใหม่ทุกสัปดาห์)

4. Thiosulfate standard solution

เตรียมสารละลายมาตรฐาน 0.1N sodium thiosulfate ใช้เป็น stock solution โดยละลาย sodium thiosulfate 25 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร ค่อย ๆ ต้มให้เดือดนาน 5 นาที แล้วเทใส่ขวดสะอาดที่ล้างด้วย chromic acid ในขณะที่ยังร้อนอยู่ เก็บสารละลายนี้ไว้ในที่มืดและเย็นเมื่อต้องการใช้สารละลายที่มีความเข้มข้นน้อยกว่าจะต้องเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ต้มแล้ว

Thiosulfate standard solution ที่เตรียมได้นี้ต้องหาความเข้มข้น โดยอบ potassium dichromate ที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ชั่งอย่างละเอียด 0.2 - 0.3 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ละลายในน้ำกลั่นที่มี potassium iodide 2 กรัม ละลายอยู่จำนวน 80 ml. เติม HCl 1 N จำนวน 20 ml.พร้อมกับเขย่าและนำไปเก็บในที่มืดทิ้งไว้นาน 10 นาที จึงนำมาไตเตรตกับน้ำยา sodium thiosulfate solution ที่เตรียมไว้ เมื่อ iodide ส่วนใหญ่ละลายแล้วเติมสารละลาย starch indicator ลงไปสารละลายจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเขียวอ่อนเมื่อถึงจุด end point แล้วจึงคำนวณหาความเข้มข้นของsodium thiosulfate solution

$$\text{Normality of } Na_2S_2O_3 = \frac{\text{น้ำหนักของ } K_2Cr_2O_7 \text{ (กรัม)} \times 1000}{\text{ml. ของ } Na_2S_2O_3 \times 49.032}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3.2 การสกัด Total Nonstructure Carbohydrate

ใช้วิธี acid extraction โดยชั่งตัวอย่างกิ่งกาแฟที่แห้งสนิท 0.25 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml. เติม 0.2N H_2SO_4 จำนวน 40 ml. ปิดด้วยแผ่นอลูมิเนียม แล้วนำไปอบในตู้อบตัวอย่างพืชที่อุณหภูมิ 100 อองศาเซลเซียส เป็นเวลานา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาวางทิ้งให้เย็น กรองด้วยกรดาษกรอง Whatmanเบอร์ 42 แล้วปรับ pH ของสารละลายที่กรองได้ให้เป็นกลางด้วย NaOH และปรับปริมาตรให้เป็น 50 ml. ด้วยน้ำกลั่น เทสารละลายมา 100 ml. เพื่อนำไปหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตในรูป Total Nonstructure Carbohydrate ต่อไป

4.3.3 การวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรต

ดูดสารละลายจากข้อ1จำนวน 5 ml. ใส่ในหลอดทดลองขนาด 25x200 มม. พร้อมกับทำ blank โดยใช้น้ำกลั่น 5 ml. เติมน้ำยาShaffer-Somogyi Carbonate 50 จำนวน 5 ml. พร้อมทั้งเขย่า ปิดจุกและนำ test tube ไปวางแช่ไว้ในน้ำเดือด 15 นาที ค่อยๆยกหลอดทดลองออกโดยไม่ให้สะเทือน วางไว้ให้เย็นเป็นเวลา 4 นาที เปิดจุกออกและค่อยๆ เติมIodide-oxalate ลงข้างหลอดๆ ละ2 ml. เติม 2 N H_2SO_4 หลอดละ 3 ml. เขย่าให้ Cu_2Oละลาย นำไปทำให้เย็นโดยแช่ในน้ำเย็น 5 นาที เขย่าสารละลาย 2 ครั้ง นำสารละลายมาไตเตรตกับ 0.005 N $Na_2S_2O_3$ โดยใช้สารละลายแป้งเป็น indicator

ปริมาตรของ $Na_2S_2O_3$ที่ใช้ในการไตเตรตตัวอย่าง ลบด้วยปริมาตรของ$Na_2S_2O_3$ที่ใช้ในการไตเตรต blank นำมาเปรียบเทียบกับปริมาตรที่ใช้ไตเตรต standard glucose แล้วคำนวณหาปริมาณ glucose (equivalent) ในสารละลายตัวอย่าง 5 ml. ผลการวิเคราะห์ที่ได้จะเป็น mg.glucose equivalent

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. แปลงทดลองสถานีทดลองเกษตรหลวงขุนวาง กิ่งอำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยและเพิ่มผลผลิตทางเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
4. ห้องปฏิบัติการภาควิชาปฐพีศาสตร์และอนุรักษ์ศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved