บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 การตรวจหาเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่ง บนส้มโชกุนที่ติดตาบนต้นตอส้มทรอยเยอร์และคลีโอพัตราก่อนปลูกเชื้อด้วยวิธีการติดตา ในเรือนทดลอง

นำส้มโชกุนที่ติดตาบนต้นตอส้มพันธุ์ทรอยเยอร์ (Troyer citrange) และคลีโอพัตรา (Cleopatra mandarin) อายุประมาณ 1 ปี จำนวนอย่างละ 25 ต้น จากบริษัทอะโกรเทค จังหวัดแพร่ ปลูกในกระถางดินเผาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว ใช้ดินผสมขี้เถ้าแกลบเป็นวัสดุปลูก ในสภาพโรงเรือนทดลอง ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่ง ทำการตรวจสอบว่าต้นส้มที่นำมาทดลอง เป็นส้มที่ปลอดโรคหรือไม่ โดยเก็บตัวอย่างใบที่ 5 นับจากยอด จำนวน 20 ใบ นำไปตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งโดยใช้เทคนิค PCR

3.2 การปลูกเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งด้วยวิธีการติดตา บนส้มบนส้มโชกุนที่ติดตาบนต้นตอส้มทรอยเยอร์ และคลีโอพัตรา ในเรือนทดลอง

นำส้มจากข้อ 3.1 มาทำการปลูกเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่ง ด้วยวิธีการติดตาด้วยส้มโชกุนที่เป็นโรคกรีนนิ่ง โดยติดตาให้ตาแรกห่างจากโคนต้น 20 เซนติเมตร และตาถัดไปห่างจากตาแรก 10 เซนติเมตร วางแผนการทดลองแบบ completely randomized disign (CRD) ประกอบด้วย 10 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ดังต่อไปนี้

กรรมวิธีที่ 1 ติดตาด้วยตาที่เป็นโรค จำนวน 4 ตาต่อต้น บนต้นตอทรอยเยอร์
กรรมวิธีที่ 2 ติดตาด้วยตาที่เป็นโรค จำนวน 3 ตาต่อต้น บนต้นตอทรอยเยอร์
กรรมวิธีที่ 3 ติดตาด้วยตาที่เป็นโรค จำนวน 2 ตาต่อต้น บนต้นตอทรอยเยอร์
กรรมวิธีที่ 4 ติดตาด้วยตาที่เป็นโรค จำนวน 1 ตาต่อต้น บนต้นตอทรอยเยอร์
กรรมวิธีที่ 5 ชุดควบคุมของส้มโชกุนต้นตอทรอยเยอร์
กรรมวิธีที่ 6 ติดตาด้วยตาที่เป็นโรค จำนวน 4 ตาต่อต้น บนต้นตอคลีโอพัตรา
กรรมวิธีที่ 7 ติดตาด้วยตาที่เป็นโรค จำนวน 3 ตาต่อต้น บนต้นตอคลีโอพัตรา
กรรมวิธีที่ 8 ติดตาด้วยตาที่เป็นโรค จำนวน 2 ตาต่อต้น บนต้นตอคลีโอพัตรา
กรรมวิธีที่ 9 ติดตาด้วยตาที่เป็นโรค จำนวน 1 ตาต่อต้น บนต้นตอคลีโอพัตรา
กรรมวิธีที่ 10 ชุดควบคุมของส้มโชกุนต้นตอคลีโอพัตรา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

นำใบส้มไปตรวจหาเชื้อสาเหตุด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) หลังปลูกเชื้อทุก 2 เดือน

3.3 บันทึกขนาดพื้นที่ใบ

ก่อนการปลูก และหลังปลูกทุก 2 เดือน บันทึกพื้นที่ใบด้วยเครื่องวัดพื้นที่ใบ และข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least Significant Difference (LSD)

3.4 บันทึกสีใบ

บันทึกสีใบด้วยเครื่องวัดสีใบ (chromameter) ซึ่งใช้ระบบ CIE 1976 (L* a* b*) ค่าที่ได้มี 3 ค่า คือ

ค่า L* คือ ค่าความสว่าง มีช่วง 0 คือมืดดำ ถึง 100 คือขาวสว่าง

ค่า a* คือ ค่าสีตามแกนนอน มีช่วง +60 คือสีม่วงแดง ถึง -60 คือมีสีเขียวอมน้ำเงิน

ค่า b* คือ ค่าสีตามแกนตั้ง มีช่วง +60 คือสีเหลือง ถึง -60 คือสีน้ำเงิน

ค่าที่ได้ดังกล่าวนำมาคำนวณหาค่าองศาของสี (hue) โดยคำนวณจาก

$$Hue = 180 - \tan^{-1} b/a$$

นำข้อมูลดังกล่าวมาวิเคราะห์ทางสถิติ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least Significant Difference (LSD)

3.5 บันทึกสัดส่วนระหว่างกิ่งพันธุ์กับต้นตอส้ม

วัดสัดส่วนเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นของกิ่งพันธุ์ดีกับต้นตอ วัดส่วนของลำต้นในแนวระดับเหนือและใต้รอยต่อ 5 เซนติเมตร โดยใช้เวอร์เนียแคลิเบอร์ หลังปลูกเชื้อได้ 12 เดือน

3.6 สำรวจการเกิดโรคกรีนนิ่ง และทริสเตซ่า รวมทั้งวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารบนส้มพันธุ์โชกุน และเขียวหวานที่ติดตาบนต้นตอส้มพันธุ์ต่างๆ ในสภาพสวนที่มีการจัดการโดยเกษตรกร

ปลูกส้มโชกุนต้นตอโวคาเมอเรียนา ทรอยเยอร์ คลีโอพัตรา และแรงเพอไลม์ ส้มพันธุ์เขียวหวานต้นตอทรอยเยอร์ โวคาเมอเรียนา และแรงเพอไลม์ อายุประมาณ 1 ปี อย่างละ 16 ต้น รวมทั้งหมด 112 ต้น ที่บ้านกองทราย ต. หนองผึ้ง อ. สารภี จ. เชียงใหม่ ในสภาพสวนที่มีการจัดการโดยเกษตรกร วางแผนการทดลองแบบ observation การทดลองประกอบด้วย 7 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 8 ซ้ำๆ ละ 2 ต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 1 ส้มพันธุ์โชกุนติดตาบนต้นตอส้มพันธุ์ โวคาเมอเรียนา
กรรมวิธีที่ 2 ส้มพันธุ์โชกุนติดตาบนต้นตอส้มพันธุ์ ทรอยเยอร์
กรรมวิธีที่ 3 ส้มพันธุ์โชกุนติดตาบนต้นตอส้มพันธุ์ คลีโอพัตรา
กรรมวิธีที่ 4 ส้มพันธุ์โชกุนติดตาบนต้นตอส้มพันธุ์ แรงเพอไลม์
กรรมวิธีที่ 5 ส้มพันธุ์เขียวหวานติดตาบนต้นตอส้มพันธุ์ ทรอยเยอร์
กรรมวิธีที่ 6 ส้มพันธุ์เขียวหวานติดตาบนต้นตอส้มพันธุ์ คลีโอพัตรา
กรรมวิธีที่ 7 ส้มพันธุ์เขียวหวานติดตาบนต้นตอส้มพันธุ์ แรงเพอไลม์

บันทึกอาการผิดปกติที่พบบนต้นส้มโชกุนและเขียวหวานต้นตอต่างๆ ทุก 3 เดือน

3.7 ตรวจหาเชื้อสาเหตุของโรค

ตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่ง และทริสเตซ่าในใบส้มที่แสดงอาการผิดปกติ ด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) และเทคนิค ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) ทุก 3 เดือน

1. การตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่ง *Candidatus* Liberobacter asiaticus ด้วยเทคนิค PCR

การเก็บตัวอย่างใบส้ม

สุ่มเก็บตัวอย่างใบส้มจากโรงเรือนทดลอง ทั้งหมด 50 ตัวอย่าง โดยเก็บใบที่ 5 นับจากยอด จำนวน 30 ใบต่อต้น สุ่มเก็บรอบต้นทั้ง 4 ทิศ นำมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น และเช็ดให้แห้ง ใช้ใบมีดโกนกรีดเอาเฉพาะเส้นกลางใบ แล้วนำไปชั่งให้ได้น้ำหนัก 1.0 กรัม ของแต่ละตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างใบส้มจากแปลงทดลอง จำนวน 28 ตัวอย่าง จาก 7 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ โดยสุ่มเก็บรอบต้นส้ม ทั้ง 4 ทิศ จำนวน 30 ใบต่อต้น นำมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น และเช็ดให้แห้ง ใช้ใบมีดโกนกรีดเอาเฉพาะเส้นกลางใบ จากนั้นนำไปชั่งให้ได้น้ำหนัก 1.0 กรัม ของแต่ละตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค (ดัดแปลงจาก Dellaporta, 1983)

บดตัวอย่างใบส้มด้วย grinding buffer 5 มิลลิลิตร pH 7.6 ในโกร่งที่เย็น จากนั้นนำน้ำคั้นที่บดได้ใส่ในหลอด centrifuge tube แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงในเครื่อง centrifuge ที่ 10,000 g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดน้ำใสส่วนบนออกมาใส่หลอดใหม่ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ 14,000 g นาน 25 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดน้ำใส่ส่วนบนทิ้ง จากนั้นเติม CTAB buffer 0.8 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดดังกล่าว แล้วนำไป incubate ที่ 60 องศาเซลเซียสใน heat block นาน 30 นาที ระหว่างนั้นให้เขย่าเบา ๆ ทุก ๆ 10 นาที จากนั้นจึงเติม chloroform/isoamyl alcohol (24:1) 0.8 มิลลิลิตรใน centrifuge tube ดังกล่าวแล้วเขย่าเบา ๆ ให้สารละลายผสมกัน แล้วปั่นเหวี่ยงใน microfuge ที่ 7,000 g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดเอาเฉพาะสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่พร้อมทั้งวัดปริมาตร จากนั้นเติม isopropanol ลงไปให้ปริมาตรเท่ากับสารละลายที่ดูดมาแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 g นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงเท isopropanol ทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 g นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เท 70% ethanol ทิ้งให้หมด รอจนตะกอนแห้งแล้วเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วลงไป 50 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอดังกล่าวในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเพิ่มปริมาณ GO-DNA ด้วยเทคนิค PCR

เตรียม mastermix (ภาคผนวก) 24 ไมโครลิตร ผสมกับ DNA ที่เตรียมไว้ใส่ในหลอด PCR หลอดละ 1.0 µl ปริมาตรรวมในหลอดที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาคือ 25 ไมโครลิตรโดยให้ GO-DNA เป็น positive control และน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเป็น negative control เพื่อตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยา ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นดังกล่าว เป็นการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย specific primer ที่จำเพาะกับบริเวณ 16S DNA gene ด้วย forword primer OI1 (5'-GCGCGTATGCAAGAGCGGCA-3') และ reverse primer OI2c (5'-GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3') ด้วยเครื่อง Programable Thermal Controller PTC-100™ (MJ Research) โดยตั้งโปรแกรมการทำงานในแต่ละรอบดังตารางที่ 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 โปรแกรมการทำงานของเครื่อง Thermal cycle ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่ง

Cycle	Step	Time	Temp
1	Initial denaturation	3 min	94°C
2-35	1. Denaturation	1 min	94°C
	2. Annealing	30 sec	55°C
	3. Extention	1.5 min	72°C
36	1. Denaturation	1 min	94°C
	2. Annealing	30 sec	55°C
	3. Extention	10 min	72°C
	4. Incubate	Hold	4°C

การตรวจสอบ PCR product ด้วย agarose gel electrophoresis

ชั่งผง agarose 0.3 กรัม และเติม 0.5xTBE buffer ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ลงไปใน flask ดังกล่าวและละลาย agaroseใน microwave ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องรอให้เจลเย็น ระหว่างนั้นเตรียมแผ่นรองเจลไว้ให้สะอาดและแห้ง วาง comb ตรงตำแหน่งที่เหมาะสม เทเจลลงบนแผ่นรองเจล ซึ่งใช้เวลาในการแข็งตัวประมาณ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นย้ายแผ่นเจลที่แข็งตัวแล้วลงใน electrophoresis gel tank ที่เตรียมไว้ ยก comb ออกอย่างระมัดระวัง จากนั้นเท 0.5xTBE buffer ลงไปจนท่วมผิวหน้าเจลพอดี ผสม PCR product 8 ไมโครลิตร กับ gel loading buffer 2 ไมโครลิตร นำไป load ในช่องตัวอย่างบน agarose gel โดยก่อน load PCR product ให้ช่องแรกเป็น marker ตั้งความต่างศักย์คงที่ 100 โวลท์ เวลา 40 นาที แล้วจึงเปิดเครื่อง power supply จนกระทั่งสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่ไปถึงด้านท้ายของเจล ย้อมเจลด้วย ethydium bromide นาน 10 นาที แล้วจึงล้างเจลด้วยน้ำสะอาด 2 ครั้ง ครั้งละ10 นาที หลังจากนั้นตรวจดูด้วย UV transilluminator และบันทึกภาพด้วย Gel Documentation System

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การตรวจหาเชื้อ Citrus Tristeza Virus ด้วยวิธี Double antibody sandwich-indirect ELISA (DAS-ELISA)

การเก็บตัวอย่างใบส้ม สุ่มเก็บตัวอย่างใบส้มจากแปลงทดลอง บ้านกองทราย ตำบลหนองผึ้ง อำเภอสารภี จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 28 ตัวอย่าง จาก 7 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ โดยสุ่มเก็บรอบต้นส้ม ทั้ง 4 ทิศ จำนวน 5 ใบต่อต้น นำมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น และเช็ดให้แห้ง ชั่งตัวอย่างใบส้ม 0.5 g บดในโกร่งที่แช่เย็นที่มี extraction buffer 5 มิลลิลิตร นำน้ำคั้นที่ได้ใส่ในหลอด centrifuge tube ขนาด 1.5 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนเก็บในหลอด centrifuge tube

การตรวจสอบ CTV ด้วยวิธี indirect ELISA (sandwich ELISA) เคลือบ ELISA เพลทด้วยแอนติบอดี (IgG) (จากบริษัท BIOREBA) ที่เจือจางด้วย coating buffer อัตราส่วน 1:1000 ใช้ micropipette ดูดสารละลายดังกล่าวใส่ในหลุม หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำเพลท ELISA ใส่ในกล่องชื้น ทิ้งไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 3 ชั่วโมง จากนั้นเทสารละลายในหลุมทิ้ง ล้างเพลทด้วย washing buffer หลุมละ 240 ไมโครลิตร ทำซ้ำจนครบ 3 ครั้ง เติมน้ำคั้นจากตัวอย่างใบส้มที่เตรียมไว้ใส่ในหลุมๆ ละ 200 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 คืน นำมาล้างด้วย washing buffer หลุมละ 240 ไมโครลิตร ทำซ้ำจนครบ 3 ครั้ง เติมแอนติเจนที่ผสมกับ conjugate buffer อัตราส่วน 1:1000 ใช้ micropipette ดูดสารละลายใส่ในหลุม หลุมละ 200 ไมโครลิตรใส่เพลท ELISA ในกล่องชื้นแล้วนำไปใส่ในตู้อบอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง จากนั้นสลัดสารละลายในหลุมทิ้ง แล้วนำเพลทมาล้างด้วย washing buffer หลุมละ 240 ไมโครลิตร ทำซ้ำจนครบ 3 ครั้ง เติมสารละลาย substrate โดยเตรียมจาก PNPP 0.01 กรัม ผสมกับ substrate buffer อัตราส่วน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดูดสารละลายใส่ในหลุมๆ ละ 200 ไมโครลิตร เก็บเพลทในกล่องชื้นไว้ที่อุณหภูมิห้อง (18-25) องศาเซลเซียส ในที่มืดนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปอ่อนค่าด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.8 บันทึกการเจริญเติบโตของส้มโชกุนและส้มเขียวหวานที่ติดตาบนต้นตอต่างๆ

บันทึกการเจริญเติบโตทุก 3 เดือน หลังจากปลูกส้มเป็นระยะเวลา 1 ปี โดยวัดความสูงของต้นส้ม จากโคนต้นจนถึงปลายสูงสุดของยอดความสูงต้นส้ม มีหน่วยเป็นเซนติเมตร ความกว้างทรงพุ่ม โดยวัดส่วนที่กว้างที่สุดของทรงพุ่มใน 2 แนว ตั้งฉากกัน (แนวเหนือ-ใต้ กับ แนวตะวันออก-ตะวันตก) แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย มีหน่วยเป็นเซนติเมตร ขนาดใบ โดยวัดส่วนกว้างและยาวของใบ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย มีหน่วยเป็นตารางเซนติเมตร และสัดส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นของกิ่งพันธุ์ดีกับต้นตอ วัดส่วนของลำต้นในแนวระดับเหนือและใต้รอยต่อ 5 เซนติเมตร โดยใช้เวอร์เนียแคลิเบอร์ ค่าที่ได้เป็นสัดส่วนระหว่างต้นตอกับกิ่งพันธุ์ รวมทั้งนับจำนวนเพลี้ยไก่แจ้ในช่วงที่พบว่ามีการระบาด นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD)

3.9 วิเคราะห์ปริมาณธาตุ สังกะสี (Zn), เหล็ก (Fe), แมงกานีส (Mn), และแมกนีเซียม (Mg) ในใบส้ม หลังปลูกส้ม 24 เดือน ในต้นที่เป็นโรคกับต้นปกติ

เตรียมตัวอย่าง : สุ่มเก็บตัวอย่างใบส้มจำนวน 4 ต้น จาก 16 ต้นในแต่ละกรรมวิธี โดยใบที่ 5 นับจากปลายยอดของต้นส้ม เก็บในแนว 4 ทิศของทรงพุ่ม จำนวน 20 ใบต่อต้น นำมาล้างให้สะอาดแล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดผ่านตะแกรงขนาด 0.1 ตารางเซนติเมตร นำตัวอย่างที่บดแล้วมาชั่งให้ได้ 1 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ (flask) เติมกรดไนตริก (HNO_3) ที่ผสมกับเปอร์คลอริค ($HClO_3$) อัตราส่วน 6 : 1 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร จำนวน 28 ตัวอย่าง และเตรียมสารละลายตัวอย่างมาตรฐานคือ เติมเฉพาะน้ำกับกรดผสมของไนตริกและเปอร์คลอริก (6 :1) (Blank) จากนั้นนำไปย่อยตัวอย่างพืชโดยนำขวดรูปชมพู่ดังกล่าววางบน hotplate ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปรับอุณหภูมิเป็น 220-250 องศาเซลเซียส นาน 3-4 ชั่วโมง จนเห็นควันสีขาวจากปลายขวดรูปชมพู่ และสารละลายเป็นสีใส จึงนำมาปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 5 แล้วเตรียมวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้น

การวิเคราะห์ปริมาณธาตุสังกะสี (Zn)

สังกะสีที่อยู่ในสารละลายที่ได้จากการย่อยสลาย โดยวิธีการย่อยด้วยกรดไนตริกผสมกับเปอร์คลอริก (6 :1) นำสารละลายที่ได้ไปวัดหาค่าความเข้มข้นด้วยเครื่อง Atomic absorption spectroscopy (AAS) โดยวิธีการเปรียบเทียบค่า absorption กับ standard โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานสังกะสี (Zn) ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 ppm จากสารละลายสังกะสีมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ความเข้มข้น 100 ppm ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดไนตริก 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น วิเคราะห์ด้วยเครื่อง AAS ในการวัดเริ่มวัดสารละลายมาตรฐานสังกะสีก่อน แล้วจึงวัดสารละลายตัวอย่างทั้ง 28 ตัวอย่าง รวมทั้งสารละลายที่เตรียมเป็นตัวอย่างมาตรฐาน (blank)

การวิเคราะห์ปริมาณธาตุเหล็ก (Fe)

ธาตุเหล็กที่อยู่ในสารละลายที่ได้จากการย่อยสลาย โดยวิธีการย่อยด้วยกรดไนตริกผสมกับเปอร์คลอริก (6 :1) นำสารละลายที่ได้ไปวัดหาค่าความเข้มข้นด้วยเครื่อง Atomic absorption spectroscopy (AAS) โดยวิธีการเปรียบเทียบค่า absorption กับ standard โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานเหล็ก (Fe) ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ppm จากสารละลายเหล็กมาตรฐานความเข้มข้น 1000 ppm ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดไนตริก 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น วิเคราะห์ด้วยเครื่อง AAS ในการวัดเริ่มวัดสารละลายมาตรฐานเหล็กก่อน แล้วจึงวัดสารละลายตัวอย่างทั้ง 28 ตัวอย่าง รวมทั้งสารละลายที่เตรียมเป็นตัวอย่างมาตรฐาน (blank)

การวิเคราะห์ปริมาณธาตุแมงกานีส (Mn)

ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณธาตุเหล็ก

การวิเคราะห์ปริมาณธาตุแมกนีเซียม (Mg)

แมกนีเซียมที่อยู่ในสารละลายที่ได้จากการย่อยสลาย โดยวิธีการย่อยด้วยกรดไนตริกผสมกับเปอร์คลอริก (6 :1) นำสารละลายที่ได้ไปวัดหาค่าความเข้มข้นด้วยเครื่อง Atomic absorption spectroscopy (AAS) โดยวิธีการเปรียบเทียบค่า absorption กับ standard โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานแมกนีเซียม (Mg) ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 ppm จากสารละลายแมกนีเซียมมาตรฐานความเข้มข้น 100 ppm ลงใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติม $LaCl_2$ 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น วิเคราะห์ด้วยเครื่อง AAS ในการวัดเริ่มวัดสารละลายมาตรฐานแมงกานีสก่อน แล้วจึงวัดสารละลายตัวอย่างทั้ง 28 ตัวอย่าง รวมทั้งสารละลายที่เตรียมเป็นตัวอย่างมาตรฐาน (blank)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

นำค่าการดูดกลืนแสง (Absorbent) ของธาตุสังกะสี (Zn), เหล็ก (Fe), แมงกานีส (Mn), และแมกนีเซียม (Mg) ในใบส้ม ที่ได้มาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของธาตุอาหาร แล้วนำไปเปรียบเทียบกับค่าความเข้มข้นมาตรฐานดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นมาตรฐานของธาตุอาหารต่างๆ ในใบส้มที่เจริญเติบโตเต็มที่ อายุใบ 4-7 เดือน จากกิ่งที่ไม่ติดผล

ธาตุ	ขาดแคลน	ค่อนข้างต่ำ	เพียงพอ	ค่อนข้างสูง	สูงเกินไป
N%	< 2.2	2.2-2.4	2.5-2.7	2.7-2.8	> 3.0
P%	< 0.09	0.09-0.11	0.12-0.16	0.17-0.29	> 0.3
K (CA*)%	< 0.4	0.4-0.69	0.7-1.09	1.1-1.2	> 2.3
K (FL*)%	< 0.7	0.7-1.1	1.2-1.7	1.8-2.3	> 2.4
Ca%	< 1.5	1.6-2.9	3.0-5.5	5.6-6.9	> 7.0
Mg%	< 0.16	0.16-0.25	0.26-0.6	0.7-1.1	> 1.2
S%	< 0.14	0.14-0.19	0.2-0.3	0.4-0.5	> 0.6
Cl%	-	-	< 0.03	0.4-0.6	> 0.7
Na%	-	-	< 0.16	0.17-0.24	> 0.25
B ppm	< 21	21-30	31-100	101-260	> 260
Fe ppm	< 36	36-59	60-120	130-200	> 250
Mn%	< 16	16-24	25-200	300-500	> 1000
Zn ppm	< 16	16-24	25-100	110-200	> 300
Cu ppm	< 3.6	3.6-4.9	5.0-16	17-200	> 22

แหล่งที่มา: Davies and Albrigo., 1994., Oxford, UK.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved