บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1 พืชทดลอง

ทำการเลือกต้นลิ้นจี่อายุประมาณ 15 ปี ต้น ซึ่งปลูกในแปลงของเกษตรกรบนพื้นที่สูง (ประมาณ 750 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล) ในเขตตำบลโป่งแยง อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ มีการตัดแต่งกิ่งแบบเปิดกลางทรงพุ่ม และมีการติดผลสม่ำเสมอกันทุกต้น จำนวน 10 ต้น ทำการเตรียมต้นลิ้นจี่ให้มีสภาพสมบูรณ์ก่อนเริ่มทำการทดลอง โดยการให้ปุ๋ยทางดินสูตร 13-13-21 ต้นละประมาณ 500 กรัมในระยะเริ่มติดผล หลังจากนั้น พ่นปุ๋ยเสริมทางใบ ด้วยปุ๋ยทางใบสูตร 30-20-10 + 15-0-0-15Mg + Borax 0.15 % + $Ca(NO_3)_2$ 0.1% + $ZnSO_4$ 0.1% จำนวน 1 ครั้ง หลังให้ปุ๋ยทางดิน 1 สัปดาห์ และควบคุมการทำลายของโรคและแมลง ด้วยสารเคมีเกษตรเป็นระยะๆ ตลอดการทดลอง ส่วนการให้น้ำนั้น ใช้ระบบสปริงเกลอร์ โดยเปิดน้ำให้ต้นลิ้นจี่ทุกๆ 2 วัน ครั้งละประมาณครึ่งชั่วโมง (ประมาณ 50 ลิตร) สภาพของต้นลิ้นจี่ที่ใช้ในการทดลอง แสดงไว้ในภาพที่ 7

ภาพที่ 7 สภาพของต้นลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวยที่ใช้ในการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1 7-chloro-3-methylquinoline-8-carboxylic acid (Quinmerac) (10% w/w)

2.2 Gibberellic acid (GA_3) (3% w/w ชื่อการค้า Nunto Gibb.)

2.3 Cytokinin (CPPU) (10% w/v)

2.4 Tween 20

2.5 เครื่องพ่นยาสะพายหลัง ขนาด 25 ลิตร

2.6 เครื่องวัดการสังเคราะห์แสงของพืช ยี่ห้อ CIRAS – 1 PORTABLE PHOTOSYNTHESIS SYSTEM (PP SYSTEM)

2.7 เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้า รุ่น XB 320 M ยี่ห้อPrecisa ความละเอียดทศนิยม 3 ตำแหน่ง

2.8 ตู้อบ (oven)

2.9 เครื่องบดตัวอย่างพืช ยี่ห้อ Tecator รุ่น Cyclotec No. 1093 พร้อมตะแกรงร่อนขนาด 0.5 มิลลิเมตร

2.10 อุปกรณ์ไตเตรทและปิเปต (micro pipette ขนาด 0.1-1.0 มิลลิเมตร)

2.11 เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (digital refractometer)

2.12 เครื่องวัดสี (colorimeter) ยี่ห้อ Minolta รุ่น CR-10

2.13 เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer UV - Vis)

2.14 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

2.15 ไม้บรรทัด และ เวอร์เนียร์แคลลิเปิร์ส

2.16 โถดูดความชื้น (desiccator)

2.17 pH meter

2.18 water bath

2.19 ขวดพลาสติกขนาด 60 มิลลิลิตร

2.20 ขวดสีชาขนาด 1,000 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3 วิธีการทดลอง

เริ่มการทดลองเมื่อผลลิ้นจี่มีอายุหลังติดผลประมาณ 3 สัปดาห์ โดยทำการจุ่มช่อผลในสารละลายตามกรรมวิธีศึกษา หลังจากนั้น เมื่อผลลิ้นจี่มีอายุได้ 2 เดือน หลังการติดผล จึงทำการห่อช่อผลด้วยถุงพลาสติกใส เพื่อป้องกันผลแตกและโรค แมลงที่จะเข้ามาทำลายผล แบ่งการทดลองเป็น 2 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 ผลของ ควินเมอแรก จิบเบอเรลลิกแอซิด และ ไซโตไคนิน ต่อการเติบโตและคุณภาพของผลลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย

วิธีการ วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) โดยคัดเลือกต้นลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวยที่มีการติดผลสม่ำเสมอกันจำนวน 5 ต้น (บล็อก) บำรุงดูแลรักษาให้มีความสมบูรณ์ จากนั้นทำการเลือกช่อผลลิ้นจี่ที่มีจำนวนผลต่อช่อประมาณ 16 ถึง 18 ผล กรรมวิธีละ 5 ช่อ (หน่วยการทดลอง) ซึ่งกรรมวิธีต่างๆ มีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 จุ่มช่อผลด้วย น้ำกลั่น (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 จุ่มช่อผลด้วย Quinmerac เข้มข้น 50 สตล.

กรรมวิธีที่ 3 จุ่มช่อผลด้วย GA_3 เข้มข้น 50 สตล.

กรรมวิธีที่ 4 จุ่มช่อผลด้วย CPPU เข้มข้น 50 สตล.

เริ่มทำการทดลองเมื่อผลลิ้นจี่มีอายุประมาณ 3 สัปดาห์ หลังติดผล โดยทำการชุบช่อผลในสารละลายแต่ละความเข้มข้น จำนวน 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 5 วัน และเมื่อผลลิ้นจี่อยู่ในระยะเริ่มมีการพัฒนาเนื้อผล (อายุประมาณ 8 สัปดาห์ หลังติดผล) ทำการชุบช่อผลในสารละลายชนิดเดิมอีก 2 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 5 วัน จนกระทั่งผลลิ้นจี่มีอายุได้ 2 เดือน หลังการติดผล จึงทำการห่อช่อผลด้วยถุงพลาสติกใส

การทดลองที่ 2 ผลของ ควินเมอแรก จิบเบอเรลลิกแอซิด และ ไซโตไคนิน ร่วมกับการปลิดผล ต่อการเติบโต และคุณภาพของผลลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย

วิธีการ วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) โดยคัดเลือกต้นลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวยที่มีการติดผลสม่ำเสมอกันจำนวน 5 ต้น (บล็อก) บำรุงดูแลรักษาให้มีความสมบูรณ์ จากนั้นทำการเลือกช่อผลลิ้นจี่ที่มีจำนวนผลต่อช่อประมาณ 16 ถึง 18 ผล กรรมวิธีละ 5 ช่อ (หน่วยการทดลอง) เมื่อผลลิ้นจี่มีอายุประมาณ 3 สัปดาห์ หลังติดผล ทำการชุบช่อผลในสารละลายชนิด และความเข้มข้นเดียวกับการทดลองที่ 1 จำนวน 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 5 วัน หลังจากนั้นทำการปลิดผลออกให้เหลือจำนวนผล 10 ผลต่อช่อ และเมื่อผลลิ้นจี่อยู่ในระยะเริ่มมีการพัฒนาเนื้อผล (อายุประมาณ 8 สัปดาห์ หลังติดผล) ทำการชุบช่อผลในสารละลายชนิดเดิมอีก 2 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 5 วัน จนกระทั่งผลลิ้นจี่มีอายุได้ 2 เดือน หลังการติดผล จึงทำการห่อช่อผลด้วยถุงพลาสติกใส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 8 ขนาดผลและช่อผลลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวยขณะเริ่มการทดลอง และการชุบช่อผล

ภาพที่ 9 การห่อช่อผลลิ้นจี่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4 การบันทึกข้อมูล

ทั้งสองการทดลอง ทำการบันทึกผลการทดลองในส่วนต่างๆ ดังนี้

1) การเจริญเติบโตของผล จำนวนผลต่อช่อ และการร่วงของผล

ข้อมูลการเจริญเติบโตของผล เริ่มบันทึกตั้งแต่วันที่เริ่มทำการจุ่มสาร ดังนี้

1.1 จำนวนผลต่อช่อ ทำการนับจำนวนผลภายในช่อตั้งแต่เริ่มการทดลองทุกสัปดาห์ คิดเป็นจำนวนผลต่อช่อในแต่ละสัปดาห์ หลังจากนั้นนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ผลที่เหลืออยู่ในช่อในแต่ละสัปดาห์ จนกระทั่งเก็บเกี่ยวผลผลิต

1.2 ขนาดของผล ทำการสุ่มผลลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวยทุกช่อจำนวน 1 ผลต่อช่อ วัดขนาดทั้งความกว้าง และความยาวของผลทุก 2 สัปดาห์ เพื่อวัดความเปลี่ยนแปลงของขนาดผลตั้งแต่เริ่มการทดลองจนกระทั่งเก็บเกี่ยวผลผลิต มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร

2) การเปลี่ยนแปลงอัตราการสังเคราะห์แสง ค่าประสิทธิภาพของปากใบ และอัตราการคายน้ำของใบ

โดยสุ่มวัดในใบคู่ที่ 3 นับจากโคนช่อผล ทุก1 สัปดาห์ โดยใช้เครื่องวัดอัตราการสังเคราะห์แสงของพืช ยี่ห้อ CIRAS – 1 PORTABLE PHOTOSYNTHESIS SYSTEM (PP SYSTEM) จากนั้นนำมาสร้างเป็นกราฟ เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของผลลิ้นจี่ ต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืชหลังได้รับสาร

3) คุณภาพของผลลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย

เมื่อผลลิ้นจี่แก่ เปลือกผลเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีชมพูอมแดง ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิต และนำผลลิ้นจี่ช่อเดียวกับที่ทำการวัดการเจริญเติบโตของผลมาวัดคุณภาพผลผลิตดังนี้

3.1 น้ำหนักของผล ซึ่งแบ่งเกรดตามมาตรฐานของท้องตลาด เป็น น้ำหนักผลเฉลี่ยตามเกรด A (มากกว่า 25 กรัมต่อผล) B (22-25 กรัมต่อผล) C (20-24.9 กรัมต่อผล) D (น้อยกว่า 20 กรัมต่อผล) (พิทยา และคณะ, 2546) โดยการชั่ง มีหน่วยเป็นกรัม

3.2 จำนวนผลแต่ละเกรด ซึ่งแบ่งตามมาตรฐานในข้อ 3.1 โดยการนับ มีหน่วยเป็นผล

3.3 ลักษณะภายนอกของผล โดยการแบ่งด้วยสายตาตามลักษณะภายนอกที่ปรากฏ เป็น ผลที่มีลักษณะดี (ผลไม่แตก เน่าเสีย หรือมีตำหนิ) ผลที่เปลือกมีตำหนิสีน้ำตาล ผลแตก และผลเสีย (ผลเน่า แห้ง หรือมีสภาพที่ไม่สามารถจำหน่ายได้) และนับจำนวนผลตามลักษณะดังกล่าวต่อช่อ มีหน่วยเป็นผล

3.4 น้ำหนักเมล็ด โดยการชั่ง มีหน่วยเป็นกรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 น้ำหนักเนื้อ โดยการชั่ง มีหน่วยเป็นกรัม

3.6 น้ำหนักเปลือก โดยการชั่ง มีหน่วยเป็นกรัม

3.7 ความหนาเมล็ด โดยการวัด มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร

3.8 ความหนาเนื้อ โดยการวัด มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร

3.9 ความหนาเปลือก โดยการวัด มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร

3.10 วัดสีผิวเปลือก โดยนำผลลิ้นจี่ที่ทำการเก็บเกี่ยว มาทำการวัดสีผิวเปลือก ทำการสุ่มวัดสีผิวเปลือกผลละ 2 จุด จำนวน 3 ผลต่อซ่อ โดยทำการวัดด้วยเครื่อง Color reader model CR-10 ของบริษัท Minolta ซึ่งค่าที่วัดได้จะแสดงเป็นค่า L , C* และ h* โดยที่

L (Lightness) เป็นค่าความสว่างมีค่าอยู่ในช่วง 0 ถึง 100

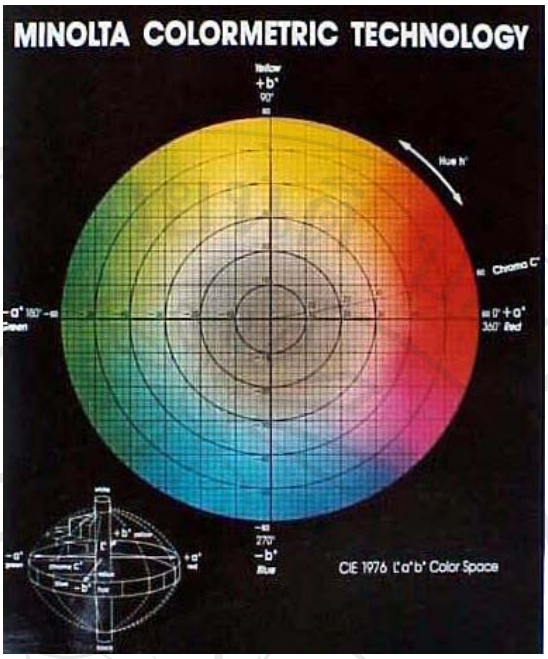
C* (Chroma) เป็นค่าความเข้มของสี ซึ่งถ้า ค่าเข้าใกล้ 0 วัตถุจะมีสีจาง ถ้าเข้าใกล้ 60 วัตถุจะมีสีเข้ม

h* (Hue) เป็นค่ามุมของสี(เฉดสี) เมื่อได้ค่าของช่วงสีแล้วจึงนำมาเปรียบเทียบกับแผ่นเทียบสีของ Minolta (CR-200) ซึ่งค่า h* เป็นค่าที่แสดงช่วงของสีวัตถุ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 10)

ตารางที่ 1 สีที่แสดงในแผ่นเทียบสี จากค่ามุมของเฉดสี (h*) ที่วัดได้

0-45	องศาแสดงสีม่วงแดงถึงสีส้มแดง	180-225	องศาแสดงสีเขียวถึงสีน้ำเงินเขียว
45-90	องศาที่แสดงสีส้มแดงถึงสีเหลือง	225-270	องศาแสดงสีน้ำเงินเขียวถึงสีน้ำเงิน
90-135	องศาแสดงสีเหลืองถึงสีเหลืองเขียว	270-315	องศาแสดงสีน้ำเงินถึงสีม่วง
135-180	องศาแสดงสีเหลืองเขียวถึงสีเขียว	315-360	องศาแสดงสีม่วงถึงสีม่วงแดง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 10 แผ่นเทียบสีของ Minolta (CR-200)

3.11 ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (total soluble solids; TSS) นำน้ำคั้นจากผลที่สุ่มได้ นำไปวัดด้วยเครื่อง digital refractometer โดยมีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์องศาบริกซ์

3.12 ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ (tritratable acidity; TA) ใช้น้ำคั้นจากผลลิ้นจี่ที่สุ่มไว้จากข้อ 3.9 จำนวน 10 มิลลิลิตร ไตเตรทด้วยสารละลายด่างมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 0.1 N โดยมีฟีนอล์ฟธาลีน (phenolphthalein) เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นอินดิเคเตอร์ จำนวน 2-3 หยด ไตเตรทจนถึงจุดยุติ (end point) คือ เมื่อสารละลายมีสีชมพูอย่างน้อย 30 วินาที แล้วนำค่าที่อ่านได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ TA ในรูปของกรดซิตริก โดยใช้สูตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

$$\% \text{ Tritratable acidity} = \frac{(\text{ml NaOH})(\text{N NaOH})(\text{meq. wt. acid})}{\text{ml sample}} \times 100$$

ml NaOH = ปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ใช้ในการไตเตรทกับน้ำคั้น (มิลลิลิตร)

N NaOH = ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (N)

meq. wt. acid = 1 มิลลิกรัมสมมูลของน้ำหนักกรด

meq. wt. acid = 0.064 (citric acid)

ml sample = ปริมาตรน้ำคั้นที่ใช้ในการไตเตรท (มิลลิลิตร)

4) การเปลี่ยนแปลงปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้าง (total nonstructural carbohydrate; TNC) ในใบ ในช่วงการเจริญเติบโตของผล

4.1 การเก็บตัวอย่างใบของลิ้นจี่

การเก็บใบจะทำการเก็บใบประกอบ (compound leaves) ตำแหน่งที่ 1 หรือ 2 ของคู่ใบที่ 3 นับจากโคนช่อผล ซึ่งเป็นใบที่ใช้ทำการวัดอัตราการสังเคราะห์แสง จากนั้นนำใบที่เก็บได้มาล้างด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้งและนำเข้าอบทันที ตามวิธีของวินัย (2547) โดยใช้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (ใช้เวลาอย่างน้อย 72 ชั่วโมง) จนตัวอย่างที่ได้แห้ง จากนั้นนำไปบดละเอียด ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 0.5 มิลลิเมตร เก็บตัวอย่างแห้งที่ร่อนแล้วใส่ถุงพลาสติก แล้วเก็บรักษาในโถดูดความชื้น (desiccator) รอการวิเคราะห์ต่อไป และก่อนการวิเคราะห์ นำตัวอย่างพืชไปอบอีกครั้งหนึ่งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง และทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วจึงนำมาชั่งเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรต โดยวิเคราะห์ในรูปของ total nonstructural carbohydrate (TNC) โดยใช้วิธีสกัดของ Smith *et al.* (1964) และหาปริมาณ TNC โดยใช้วิธี Nelson's reducing sugar procedure (Hodge and Hofreiter, 1962)

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดที่ไม่ใช่โครงสร้าง (total nonstructural carbohydrate; TNC)

4.2.1 สกัดตามวิธีของ Smith *et al.* (1964) ดัดแปลงโดย สุจริต (2531) โดยชั่งตัวอย่างพืชที่อบแห้งสนิทและบดแล้ว 0.05 กรัม เติม 0.2 N H_2SO_4 40 มิลลิลิตร ปิดปากภาชนะด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ แล้วอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงใน hot air oven

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

หลังจากนั้นนำออกจากตู้อบทิ้งไว้ให้เย็น ปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย 0.1, 1 และ 2 N NaOH กับ 0.5 และ 5% H_2SO_4 แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ใส่ขวดพลาสติกขนาด 60 มิลลิลิตรเพื่อรอการวิเคราะห์

4.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณ TNC โดยวิธีของ Nelson (Hodge and Hofreiter, 1962) ดูดสารละลายที่สกัดได้มา 1 มิลลิลิตรใส่หลอดทดสอบขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลาย ดี-กลูโคส เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มา 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดสอบขนาด 10 มิลลิลิตร รวม 10 หลอด เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสมาตรฐาน 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.125, 0.15, 0.175, 0.2, 0.225 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติม Nelson's alkaline copper reagent หลอดละ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปิดด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยด์ นำไปแช่ water bath อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำให้เย็นโดยนำไปวางในน้ำเย็น แล้วเติมสารละลาย arsenomolybdic acid reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ตะกอนของ Cu_2O ละลายจนหมด เติมน้ำกลั่น 7 มิลลิลิตร เขย่าอีกครั้งหนึ่ง (จะได้ปริมาณ 10 มิลลิลิตร) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำสารละลายไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) จากเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้ค่า standard จากสารละลาย ดี-กลูโคส ซึ่งทราบความเข้มข้นแล้ว เป็นตัวเปรียบเทียบ ผลที่ได้แสดงเป็น มิลลิกรัม ดี-กลูโคส / กรัมน้ำหนักแห้ง

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์สถิติด้วยโปรแกรม SPSS 10.0 for Windows และโปรแกรม Statistix 8

สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. แปลงลิ้นจี่ของเกษตรกรบนพื้นที่สูง (ประมาณ 750 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล) ในตำบลโป่งแยงอำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาดำเนินการ

ตั้งแต่เดือน มกราคม พ.ศ. 2549 – มิถุนายน พ.ศ. 2549

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved