

### บทที่ 3

#### อุปกรณ์และวิธีการที่ใช้ในการทดลอง

##### 1. วัสดุทดลอง

ต้นกล้าโกโก้สายพันธุ์ Na33 x UIT1 อายุประมาณ 4 เดือน จำนวน 1,528 ต้น ทำการย้ายปลูกลงในถาดพลาสติกสีดำขนาด 15x17 นิ้ว ในเรือนเพาะชำจนสามารถตั้งตัวได้แล้ว (ประมาณ 2 สัปดาห์) จึงย้ายต้นกล้าไปตั้งไว้กลางแจ้ง แต่ละต้นวางห่างกัน 50x50 เซนติเมตร เพื่อให้ต้นกล้าได้รับแสงอย่างเต็มที่

##### 2. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่

2.1 Adenine

2.2  $ZnSO_4$

2.3 Sucrose

2.4 น้ำยางพารา

##### 3. เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

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

เป็นเครื่องมือใช้วัด ค่าความต้านทานของปากใบ มีส่วนประกอบที่สำคัญอยู่ 2 ส่วน คือส่วนที่ใช้จับใบพืช และตัวเครื่อง ก่อนที่จะนำเครื่องไปวัดกับใบพืชจะต้องมีการวัดค่านับ (count) จากแผ่นคาลิเบรชัน(calibration plate)ก่อน บนแผ่นคาลิเบรชันประกอบด้วย ช่องพรุนขนาดต่าง ๆ กันจำนวน 6 ช่องเรียงกระจายอยู่ ซึ่งช่องแต่ละขนาดจะมีค่าความต้านทานที่แตกต่างกัน ค่าความต้านทานของแผ่นคาลิเบรชันมีดังนี้ คือ

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

จากนั้นหาสมการเส้นตรง  $Y = a + bx$  ของกราฟคาลิเบรชัน (calibration graph) ระหว่างค่าความต้านทานของช่องพรุนกับค่านับ

เมื่อทำการวัดค่านับจากใบพืช ซึ่งใช้หลักการตรวจวัดระยะเวลาที่ใช้สำหรับการระเหยของน้ำจากใบพืช ผ่านทางปากใบออกมายังอากาศแห้งภายในช่องว่างของส่วนที่ใช้จับใบพืช จนอากาศแห้งมีความชื้นถึงจุดที่กำหนด ระยะเวลาที่ใช้จะเป็นสัดส่วนผกผันกับขนาดของรูของปากใบบนใบพืช

ค่านับที่ได้จากการวัดบนใบโกโก้ สามารถนำมาแปรค่าออกมาเป็นค่าความต้านทานของปากใบ (stomatal resistance,  $r_s$ ) ซึ่งใช้คำนวณค่าการเปิดปากใบ (stomatal conductance,  $g_s$ ) โดยใช้สมการ

$$\text{Stomatal conductance} = 1/\text{Stomatal resistance (cm.s}^{-1}\text{)}$$

### 3.2 เครื่องวัดค่าศักย์ของน้ำในใบ (Pressure bomb)

เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดค่าศักย์ของน้ำภายในใบพืช (Leaf water potential,  $\psi_1$ ) ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วน คือ กระจกบอกความดัน (pressure chamber) เป็นส่วนที่ทนแรงดันก๊าซได้ดี ในส่วนนี้จะมีย่านปิดบอกระดับความดันภายในกระจก มีหน่วยเป็นบาร์ (bar) และ ส่วนถังบรรจุก๊าซไนโตรเจน

วิธีการวัดทำได้โดยตัดใบพืชที่ต้องการวัดค่าศักย์ของน้ำในใบ ใส่ลงในกระจกบอกความดัน

ให้ส่วนของก้านใบไหลออกทางช่องของฝาปิดที่ปิดสนิท ปล่อยก๊าซไนโตรเจนจากถังเข้าไปในกระบอกความดันอย่างช้า ๆ เมื่อแรงดันในกระบอกมีมากพอจะทำให้ น้ำในใบพืช (sap) ไหลออกทางก้านใบ จนสามารถมองเห็นได้ที่บริเวณรอยตัดของก้านใบบนช่องของฝาปิดกระบอกความดัน ปริมาณความดันของก๊าซไนโตรเจนที่จุดนี้ถือเป็นจุดของค่าศักย์ของน้ำในใบพืช โดยอ่านค่าความดันก๊าซในกระบอกความดันจากหน้าปัดบอกความดัน หลังจากทราบค่าความดันแล้ว จึงปิดวาล์วของถังก๊าซไนโตรเจนพร้อมทั้งระบายก๊าซที่ค้างอยู่ในกระบอกความดันออก และเริ่มต้นวัดใบใหม่ตามวิธีการข้างต้นได้ต่อไป

### 3.3 เครื่องมือวัดความเข้มแสง (Photometer Li-Cor, Inc ; LI 185 B)

ใช้วัดความเข้มแสงที่ตกกระทบบนระนาบผิวใบ ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ตัวเครื่องและส่วนรับแสง (Quantum sensor) ซึ่งเป็นส่วนที่ใช้รับแสงตกกระทบ ในการวัดจะนำไปวัดที่ตำแหน่งที่ระนาบผิวใบที่รับแสง ค่าที่อ่านได้เป็น Photon flux density มีหน่วยเป็น  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

### 3.4 เครื่องวัดความชื้นสัมพัทธ์ (Wet and dry bulb thermometer)

ใช้วัดอุณหภูมิของอากาศ และความชื้นสัมพัทธ์ (Relative humidity) สำหรับการวัดความชื้นสัมพัทธ์นี้ จะใช้เทอร์โมมิเตอร์ทั้งชนิดกระเปาะเปียก (wet bulb thermometer) และกระเปาะแห้ง (dry bulb thermometer) แขนงไว้ในแนวระดับที่ความสูงประมาณ 1 เมตร จากพื้นดินไว้สักครู่ จากนั้นอ่านค่าอุณหภูมิกระเปาะเปียกและกระเปาะแห้ง แล้วนำผลต่างระหว่างอุณหภูมิของกระเปาะทั้งสองมาเปรียบเทียบกับมาตรฐาน ก็จะทราบค่าความชื้นสัมพัทธ์ในขณะนั้นมีหน่วยเป็น เปอร์เซ็นต์

### 3.5 เครื่องวัดพื้นที่ใบ (Leaf area meter)

ใช้วัดพื้นที่ใบโกโก้ โดยเด็ดใบโกโก้หมดต้น นำแต่ละใบมาผ่านเข้าเครื่องมือวัดพื้นที่ใบแล้วอ่านค่าปรากฏบนจอภาพ มีหน่วยเป็นตารางเซนติเมตร

### 3.6 ตัวอย่างพืช

ใช้ใบส่วนต่าง ๆ ของพืช ได้แก่ ใบ ลำต้น และราก เพื่อหาน้ำหนักแห้ง โดยปรับใช้ที่อุณหภูมิ 80 °C เวลานาน 48 ชั่วโมง

### 3.7 เครื่องชั่งน้ำหนัก

ใช้ชั่งน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ของตัวอย่างพืช ได้แก่ ใบ ลำต้น ราก และชั่งน้ำหนักสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

### 3.8 เครื่องเหวี่ยงเพื่อแยกชั้นของสารละลาย

เป็นเครื่องมือใช้ในการสกัดหาปริมาณ โปรตีน และคลอโรฟิลล์ เพื่อใช้ในขั้นตอนแยกชั้นของสารละลายระหว่างคลอโรฟอร์ม และชั้นผสมของน้ำกับเมทานอล ในความเร็วรอบ 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นจึงนำชั้นของสารละลายแต่ละชั้นไปหาปริมาณคลอโรฟิลล์และโปรตีนตามลำดับ

### 3.9 เครื่องมือวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

เป็นเครื่องมือใช้ในวิธีการหาปริมาณโปรตีน และคลอโรฟิลล์ โดยวัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลายคลอโรฟอร์ม ที่ความยาวคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร (nm) ในขั้นตอนของวิธีการหาปริมาณคลอโรฟิลล์ โดยมีคลอโรฟอร์มบริสุทธิ์เป็นตัวเปรียบเทียบ (blank) และหาปริมาณโปรตีนที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ในขั้นตอนสุดท้ายของวิธีการเช่นกัน โดยมีไทลูอินเป็นตัวเปรียบเทียบ

### 3.10 ไมบรรัต

ใช้วัดความสูง และความยาวยอดของต้นกล้าโกโก้ที่เปลี่ยนแปลงไป

### 3.11 เวอร์เนียร์คาลิเปอร์

ใช้วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของต้นกล้าโกโก้ โดยทำการวัดจากจุดที่สูงจากระดับ

ผิวติน 10 เซนติเมตร

### 3.12 อุปกรณ์และเครื่องแก้วสำหรับหาปริมาณคลอโรฟิลล์และโปรตีน

เป็นเครื่องแก้วที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป เช่น

1. หลอดทดลองขนาดเล็ก และขนาดกลาง
2. บีเบต ขนาด 1 มล. 10 มล.
3. บีกเกอร์ขนาด 50 มล. 100 มล. 200 มล. 500 มล.
4. กระบอกตวงขนาด 10 มล. 50 มล. 100 มล.
5. หลอดแก้วเฉพาะเครื่องเหวี่ยงเพื่อแยกชั้นของสารละลาย

### 3.13 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้สกัดโปรตีนและคลอโรฟิลล์ในใบตามวิธีของ Faber and Aspinal

(1981) ดังนี้

1. เมทานอล (Methanol)
2. คลอโรฟอร์ม (Chloroform)
3. โทลูอีน (Sulphur-free toluene)
4. กรดอะซิติก (Glacial acetic acid)
5. กรดฟอสฟอริก (6-Orthophosphoric acid)
6. นินไฮดริน (Ninhydrin)
7. น้ำกลั่น (Distilled water)
8. Chromatographically pure L-proline

### 4. วิธีการที่ใช้ในการทดลอง

ในการทดลอง จะใช้สารเคมี คือ Adenine  $ZnSO_4$  Sucrose และน้ำยาล้างภาชนะที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 3 ระดับ จัดทำใบโกลีแล้วตรวจวัดผลกระทบท่อน้ำเลี้ยงต่อไป

โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 การทดลอง ดังนี้

- การทดลองที่ 1 ผลกระทบระยะสั้นของสารเคมีที่มีต่อพฤติกรรมของปากใบและศักย์ของน้ำในใบ
- การทดลองที่ 2 ผลของ Adenine ที่มีต่อการเจริญเติบโตและสรีรวิทยาของต้นกล้า  
โกโก้ที่ปลูกกลางแจ้ง
- การทดลองที่ 3 ผลของ  $ZnSO_4$  ที่มีต่อการเจริญเติบโตและสรีรวิทยาของต้นกล้า  
โกโก้ที่ปลูกกลางแจ้ง
- การทดลองที่ 4 ผลของ Sucrose ที่มีต่อการเจริญเติบโตและสรีรวิทยาของต้นกล้า  
โกโก้ที่ปลูกกลางแจ้ง
- การทดลองที่ 5 ผลของน้ำยางพารา ที่มีต่อการเจริญเติบโตและสรีรวิทยาของต้นกล้า  
โกโก้ที่ปลูกกลางแจ้ง

## 5. การบันทึกข้อมูล

ทำการบันทึกข้อมูลต่างๆดังต่อไปนี้

### 5.1 ข้อมูลอุตุนิยมวิทยาการเกษตร

ในการบันทึกข้อมูลอุตุนิยมวิทยาการเกษตร ใช้ข้อมูลที่ได้จากสถานีตรวจอากาศ  
เกษตร ของศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี โดยทำการบันทึกข้อมูลตลอดการทดลองได้แก่

- 1.1.1 อุณหภูมิของอากาศ
- 1.1.2 ความชื้นสัมพัทธ์
- 1.1.3 ปริมาณน้ำฝน
- 1.1.4 ความเข้มแสงที่ระนาบผิวใบ
- 1.1.5 อัตราการระเหยน้ำเฉลี่ยต่อวัน (E-pan)

### 5.2 อัตราการเจริญเติบโต

เป็นการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้าโกโก้ที่ปลูกกลางแจ้ง ก่อนและหลังได้รับสารเคมี ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ตามการทดลองที่ 2-5 ทำการบันทึกข้อมูลต่าง ๆ ดังนี้

5.2.1 น้ำหนักแห้งของต้นโกโก้

5.2.2 น้ำหนักแห้งของใบโกโก้

5.2.3 น้ำหนักแห้งของรากโกโก้

ใช้ต้นกล้าโกโก้จำนวนครั้งละ 10 ต้น โดยครั้งแรกเมื่อเริ่มต้นการทดลอง (0 วัน) และครั้งต่อ ๆ ไป เมื่อเริ่มการทดลองไปได้ 30 60 90 และ 120 วันตามลำดับ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาอัตราการเจริญเติบโต

### 5.3 การพัฒนาของใบ

เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงพื้นที่ใบ จำนวนใบ และขนาดเฉลี่ยของใบ ของต้นกล้าโกโก้ที่ปลูกกลางแจ้ง ก่อนและหลังได้รับสารเคมีในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ในการทดลองที่ 2 ถึง 5 ใช้ต้นกล้าโกโก้จำนวนครั้งละ 10 ต้น โดยครั้งแรกเมื่อเริ่มต้นการทดลอง (0 วัน ) และครั้งต่อ ๆ ไปเมื่อเริ่มการทดลองไปได้ 30 60 90 และ 120 ตามลำดับ

### 5.4 ความสูงและขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของลำต้น

เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงความสูง และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของลำต้นของต้นกล้าโกโก้ที่ปลูกกลางแจ้ง ในการทดลองที่ 2 ถึง 5 โดยใช้ต้นกล้าโกโก้จำนวน 10 ต้น สำหรับเส้นผ่าศูนย์กลางของต้นกล้าโกโก้ วัดจากจุดที่ทำเครื่องหมายไว้ห่างจากวัสดุปลูกประมาณ 10 เซนติเมตร และความสูงของลำต้นจากจุดเดียวกันถึงปลายยอด วัดครั้งแรกเมื่อเริ่มการทดลองและครั้งต่อไป เมื่อเริ่มการทดลองได้ 30 60 90 และ 120 วันตามลำดับ โดยต้นที่ทำการบันทึกข้อมูลจะเป็นต้นกล้าในชุดเดียวกันหมด

### 5.5 การตรวจสอบปริมาณคลอโรฟิลล์ (Faber and Aspinall, 1981)

นำเนื้อเยื่อสด 0.5 กรัม เติมน้ำละลายที่เป็นส่วนผสมของ เมทานอล

คลอโรฟอร์ม และน้ำอัตราส่วน 12:5:3 (โดยปริมาตร) 5 มล. บดให้ละเอียด แล้วเติมสารละลายดังกล่าวอีก 2 ครั้ง เพื่อล้างส่วนผสมสีในหลอดที่ใช้สำหรับเครื่องแยกชั้นของสารละลาย แล้วเติมน้ำกลั่นและคลอโรฟอร์มอีกอย่างละ 5 มล. นำไปเหวี่ยงเพื่อแยกชั้นของสารละลาย โดยเครื่องเหวี่ยงแยกชั้นของสารละลายที่ความเร็วรอบ 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกสารละลายส่วนล่างเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วแบ่งมา 1 มล. เพื่อเติมคลอโรฟอร์มอีก 19 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 663 และ 645 นาโนเมตร ค่าที่ได้ นำไปคำนวณโดยอาศัยสมการที่กำหนดเพื่อหาปริมาณคลอโรฟิลล์ดังนี้

$$\text{ปริมาณ Chlorophyll} = 0.01272 A_{663} - 0.002583 A_{645}$$

โดย A = ค่า Optical density

#### 5.6 การตรวจสอบปริมาณโปรตีน (Faber and Aspinall, 1981)

นำเนื้อเชื้อสด 0.5 กรัม เติมสารละลายผสมระหว่าง เมธานอล คลอโรฟอร์ม และน้ำอัตราส่วน 12:5:3 (โดยปริมาตร) 5 มล. บดให้ละเอียด แล้วเติมสารละลายดังกล่าวอีก 2 ครั้ง เพื่อล้างส่วนผสมในหลอดที่ใช้สำหรับเครื่องแยกชั้นของสารละลาย เติมน้ำกลั่นอีก 8 มล. นำไปเหวี่ยงเพื่อแยกชั้นของสารละลาย โดยเครื่องแยกชั้นของสารละลายที่ความเร็วรอบ 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำเอาส่วนที่แยกได้ในชั้นบน เติมสารละลายกรดอะซิติก และ นินไฮดริน อย่างละ 5 มล. ก่อนนำไปต้มเป็นเวลา 45 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมสารโกลูอิน เขย่าให้ผสมกันแล้วทิ้งไว้อีก 30 นาที จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องมือวัดการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร แล้วจึงนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานของโปรตีนที่ทราบความเข้มข้นแล้ว เพื่อเทียบหาค่าปริมาณโปรตีนที่มีในใบโกโก้ต่อไป

#### 5.7 การศึกษาการแตกใบอ่อนของต้นกล้าโกโก้

ใช้ต้นกล้าโกโก้จำนวน 10 ต้น บันทึกข้อมูล จำนวนครั้งในการแตกใบอ่อน และระยะในการแตกใบอ่อนในแต่ละครั้ง ซึ่ง Greathouse et al (1971) ได้แบ่งระยะการแตกใบอ่อนของโกโก้จากการสังเกตลักษณะของปลายยอด (Shoot tips) และการพัฒนาของใบ



ออกเป็น 5 ระยะคือ

Flushing 1 (F1) เป็นระยะต่อเนื่องมาจากช่วงพักตัว ตาของโกโก้บวมเป่ง ระยะนี้เชื้อหุ้มตาจะขยายตัวออก F1 นี้จะใช้เวลาประมาณ 10.4 วัน

Flushing 2 (F2) เป็นระยะที่ใบคล้อออกเห็นเป็นยอด ปล้องจะขยายตัวยาวขึ้นจนถึงใบสุดท้ายคล้อออกเต็มที่แล้ว ใช้เวลาประมาณ 11.9 วัน

Interflush 1 (I1) เป็นระยะที่ใบคล้อออกมาแล้วมีขนาดโตเต็มที่ จนถึงเริ่มแก่ (mature) ตาหยุดพักตัว มีการสร้างเชื้อหุ้มตาหยุดบาง ๆ ระยะนี้ใช้เวลาประมาณ 20.6 วัน

Interflush 2 (I2) เป็นระยะที่ตาหยุดยังคงพักตัว จะไม่มีการเพิ่มขนาดทั้งใบและยอด ใบซึ่งขยายตัวเต็มที่แล้วจะมีสีเขียวเข้ม ส่วนยอดที่ได้เจริญมาแล้ว จะยังคงมีสีเขียว ระยะนี้ใช้เวลาประมาณ 16.4 วัน

Interflush 3 (I3) ยอดที่ได้เจริญมาแล้วจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ซึ่งใช้เวลาประมาณ 6.5 วัน

#### 5.8 การศึกษาพฤติกรรมของปากใบ

ใช้เครื่อง Automatic Porometer Mk3 Delta-T Devices ในการวัดค่าความต้านทานของปากใบ ( $r_s$ ) ของใบโกโก้ใบที่ 5 และ 6 นับจากใบแรกซึ่งคล้อเต็มที่แล้ว โดยสุ่มจากต้นกล้า 2 ต้นของแต่ละกรรมวิธี การเก็บข้อมูลแต่ละครั้งจะทำการวัดในเวลา 8.00 น. 10.00 น. 12.00 น. และ 14.00 น. แต่ละครั้งบันทึกค่าเหล่านี้โดยทำในเวลาใกล้เคียงกัน ทำการวัดรวมทั้งสิ้น 5 ครั้ง โดยครั้งแรกเมื่อเริ่มต้นการทดลอง และครั้งต่อ ๆ ไปเมื่อเริ่มการทดลองไปได้ 30 60 90 และ 120 วันตามลำดับ จากนั้นนำค่า  $r_s$  ไปคำนวณหาค่า Stomatal conductance ( $g_s$ ) ต่อไป

#### 5.9 การเปลี่ยนแปลงศักย์ของน้ำในใบ ( $\Psi_1$ )

โดยใช้เครื่อง Pressure bomb วัดค่าศักย์ของน้ำในใบโกโก้ (Leaf water potential ;  $\Psi_1$ ) โดยใช้ใบที่ 5 และ 6 ซึ่งเป็นใบเดียวกับใบที่ใช้วัดค่า  $r_s$  และทำการตรวจวัดพร้อมกัน มีหน่วยเป็นบาร์

5.10 ปริมาณธาตุไนโตรเจน โปแตสเซียม และคาร์โบไฮเดรตที่สะสมในใบโกโก้  
ใช้ใบโกโก้ใบที่ 3 นับจากใบแรกที่คลี่ออกอย่างเต็มที่แล้ว ซึ่งปกติใช้หาระดับของ  
ธาตุอาหารในใบโกโก้ในประเทศปาปัวนิวกินี (Thong, 1978) ใช้ต้นกล้าครั้งละ 8 ต้น ๆ ละ  
1 ใบ วัดครั้งแรกเมื่อเริ่มต้นการทดลองและครั้งต่อ ๆ ไป เมื่อเริ่มการทดลองไปได้ 30 60  
90 และ 120 วันตามลำดับ

6. สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. โรงเรียนหลังคาบลาสติก ศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี อ.กาญจนดิษฐ์  
จ.สุราษฎร์ธานี
2. สถานีอุตุนิยมวิทยาการเกษตร ศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี
3. แปลงทดลองศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี
4. อาคารปฏิบัติการ ศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี
5. อาคารปฏิบัติการ ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร อ.สวี จ.ชุมพร