บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการศึกษา

3.1 อุปกรณ์และวัสดุที่ใช้ในการปลูกถั่วเหลือง

1. กระถางพลาสติกขนาดกว้าง X ยาว เท่ากับ 25 X 10 เซนติเมตร
2. สายยางและตัวต่อเข้ากับปั๊มลม
3. สารอาหารที่ใช้ในการปลูกพืชตามสูตรของ Hoagland และ Arnon และนำมาดัดแปลงตามวิธีการเตรียมของนันทนา อังกินันท์ (2526)
4. เครื่องวัด pH
5. เครื่องวัดการนำไฟฟ้า (EC meter)
6. โฟมและฟองน้ำ
7. ก้านลูกโป่ง

3.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาทางสรีรวิทยาของพืช

ก. อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาอัตราการเจริญเติบโต

1. เครื่องวัดพื้นที่ใบ (Portable area meter รุ่น LI 3000 A)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่งของกรัม
3. เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่งของกรัม
4. ตู้อบตัวอย่างพืช (hot air oven)
5. ตู้ดูดความชื้น
6. ซองกระดาษสีน้ำตาลสำหรับเก็บตัวอย่างพืช

ข. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสง

1. เครื่องวัดอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสง (Portable photosynthesis รุ่น LCA 4)
2. คอมพิวเตอร์และเครื่องพิมพ์

ค.อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์

1. 80 % acetone
2. หลอดทดลองขนาดต่างๆ พร้อมตะแกรงวางหลอด
3. หลอดทดลองที่ใช้กับเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (cuvette)
4. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer รุ่น Spectronic Genesis 5)
5. กระบอกตวงขนาด 10 ml

6. โกร่งบด

7. Eppendorf tube ขนาด 1.5 ml พร้อมที่วาง

8. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge ยี่ห้อ Hettich รุ่น EBA 85)

9. ตู้แช่แข็ง (deep freezer อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส)

10. ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 20-200 µl และ 200-1000 µl

11. Pasteur pipette

ง. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวัดปริมาณไอออนเกลือ

ปริมาณไอออนโซเดียมและโปแตสเซียม

1. digest block สำหรับย่อยสลายตัวอย่างพืช

2. หลอดแก้วที่ใช้สำหรับ digest block

3. ปิเปตแก้วขนาด 5 ml และขนาด 10 ml พร้อมลูกยาง

4. กรดไนตริคเข้มข้น (conc.HNO_3)

5. กรดเปอร์คลอริค (70 % $HClO_4$)

ปริมาณไอออนคลอไรด์

1. ถ้วยเผา (crucible)

2. water bath

3. กรวยแก้ว

4. กระดาษกรอง

5. ไมโครปิเปต

6. Erlenmeyer flask ขนาด 50 ml

7. หลอดทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 เซนติเมตรพร้อมตะแกรงวางหลอด

8. Vortex mixer (IKA MS1)

9. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer รุ่น Spectronic Genesis 5)

10. แคลเซียมออกไซด์ (CaO)

11. Mercuric thiocyanate (Hg (SCN_2))

12. Ferric Ion (Fe^{3+})

3.3 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาและในเรือนเพาะชำ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4 วิธีดำเนินการทดลอง

การศึกษาการตอบสนองของถั่วเหลืองพันธ์ต่างๆ ต่อภาวะเค็ม ดำเนินการทดลองตามขั้นตอนดังนี้คือ ให้พืชได้รับภาวะเค็มในระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นแล้วศึกษาวิเคราะห์ด้านต่างๆ ดังนี้

การตอบสนองทางด้านสรีรวิทยา ได้แก่ การวิเคราะห์การเจริญเติบโต อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสง ประสิทธิภาพการใช้น้ำ ปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบและปริมาณไอออนของเกลือในส่วนต่างๆ ของต้น

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in Completely Randomized Design (CRD) โดยใช้ถั่วเหลือง 2 พันธุ์คือ สจ.5 และ มข.35 และให้เกลือโซเดียมคลอไรด์ 4 ระดับคือ 0 40 80 และ 120 มิลลิโมลาร์ จำนวนซ้ำสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ ปริมาณไอออนเกลือและการเจริญเติบโตใช้ 4 ซ้ำ สำหรับการวัดอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงใช้ 8 ซ้ำ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาทั้งหมดจะนำไปใช้อภิปรายผล เพื่อแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองด้านต่างๆ ที่เกิดขึ้นกับถั่วเหลืองในแต่ละพันธุ์เมื่อได้รับภาวะเค็ม

3.4.1 การปลูกพืชทดลองและการให้เกลือโซเดียมคลอไรด์

เพาะเมล็ดถั่วเหลืองบนกระดาษกรองประมาณ 4 วัน ย้ายต้นกล้าอายุ 4 วันมาปลูกในกระถางพลาสติกที่บรรจุสารละลายธาตุอาหาร Hoagland's solution (half strength) จำนวน 3 ลิตร ปลูกถั่วเหลือง 3 ต้นต่อกระถาง ควบคุม pH ที่ 6.5 เปลี่ยนสารละลายอาหารทุกสัปดาห์ เริ่มให้เกลือโซเดียมคลอไรด์หลังจากย้ายปลูกได้ 10 วัน เก็บข้อมูลหลังจากที่ถั่วเหลืองได้รับเกลือ ที่ระยะเวลา 0, 4, 8, 12, 16 และ 20 วัน

3.4.2 การวิเคราะห์การเจริญเติบโต

3.4.2.1 วัดพื้นที่ใบรวมทั้งต้นด้วยเครื่องวัดพื้นที่ใบ (Portable area meter รุ่น LI 3000 A)

3.4.2.2 การวิเคราะห์น้ำหนักแห้งต้น น้ำหนักแห้งรากและอัตราส่วนของรากต่อต้น (root/shoot ratio) โดยเก็บตัวอย่างพืชทั้งต้นแล้วแยกออกเป็นส่วนราก ลำต้น และใบ นำมาอบที่ตู้อบอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสนาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนักแห้งด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง

3.4.2.3 อัตราการเติบโตสัมพัทธ์ (Relative Growth Rate, RGR) คำนวณจากอัตราส่วนน้ำหนักแห้งต้นต่อระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ตามวิธีการของ Beadle (1993) ดังสมการ

$$RGR = \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{t_2 - t_1} \quad \text{หน่วย กรัม/กรัม-วัน}$$

W_2 และ W_1 = น้ำหนักแห้งต้นเก็บครั้งที่ 1 และ 2

t_1 และ t_2 = ระยะเวลาในการเก็บครั้งที่ 1 และ 2

3.4.2.4 Specific Leaf Weight (SLW) คำนวณจากความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งของใบรวมทั้งต้นต่อพื้นที่ใบรวมทั้งต้น (Beadle, 1993) มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อตารางเซนติเมตร (mg/cm^2)

3.4.3 การวัดอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงและประสิทธิภาพการใช้น้ำ

การวัดอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงและประสิทธิภาพการใช้น้ำ ใช้ใบที่ 3 และ 5 นับจากใบยอดที่แผ่เต็มที่ โดยใช้ Portable photosynthesis รุ่น LCA 4 ADC ซึ่งเป็นระบบเปิด (open system) ข้อมูลประกอบด้วยอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสง (A) อัตราการคายน้ำ (E) ปริมาณ CO_2 ใน substomata (vpm) และการนำที่ปากใบ (Gs)

ประสิทธิภาพการใช้น้ำ (Water Use Efficiency, WUE) คำนวณจากอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงต่ออัตราการคายน้ำ (Fischer และ Turner, 1978)

3.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ ใช้ใบที่ 3 และ 5 นับจากใบยอดที่แผ่เต็มที่ ซึ่งการวิเคราะห์เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Arnon (1949) และ Zhang และ Kirkham (1996) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

3.4.4.1 นำตัวอย่างใบถั่วเหลืองที่เก็บไว้ใน deep freezer มาบดด้วยโกร่ง โดยใช้ 80 % acetone ในอัตราส่วนน้ำหนักสดใบ 0.5 กรัมต่อ 80% acetone 10 ml แล้วนำสารสกัดจากใบที่ได้ไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 2700 g นาน 10 นาที

3.4.4.2 นำสารละลายส่วนใส 500 µl มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 663.2 และ 646.8 นาโนเมตร

3.4.4.3 คำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์โดยใช้สูตรจากสมการของ Lichtenthaler และ Wellburn (อ้างถึงใน Lichtenthaler, 1987) ดังนี้

$$C_a = 12.25\ A_{663.2} - 2.79\ A_{646.8}$$

$$C_b = 21.50\ A_{646.8} - 5.10\ A_{663.2}$$

$$C_{a+b} = 7.15\ A_{663.2} + 18.71\ A_{646.8}$$

3.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณไอออนเกลือ

การวิเคราะห์ปริมาณไอออนของเกลือ ได้แก่ ไอออนของโซเดียม (Na^+) ไอออนของโปแตสเซียม (K^+) และไอออนของคลอไรด์ในเนื้อเยื่อใบ ลำต้น และราก โดยเก็บตัวอย่างพืชทั้งต้นแล้วแยกออกเป็นส่วนราก ลำต้นและใบ นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นตัวอย่างพืชที่ได้วิเคราะห์การเจริญเติบโตแล้ว บดด้วยเครื่องปั่นละเอียดและนำตัวอย่างที่บดละเอียดแล้ว ไปชั่งด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง น้ำหนักที่ใช้ในการวิเคราะห์ Na^+ และ K^+ ใช้น้ำหนักของลำต้นและใบ 500 มิลลิกรัม ส่วนในรากใช้น้ำหนักรวมทั้งหมดต่อต้น การวิเคราะห์ Cl^- ใช้น้ำหนักต้นและใบ 200 มิลลิกรัม

ปริมาณโซเดียม (Na^+) และโปแตสเซียม (K^+)

โซเดียมและโปแตสเซียม ใช้วิธีย่อยสลายตัวอย่างแห้งของพืชด้วยกรดไนตริคและกรดเปอร์คลอริคเข้มข้น (Oweczkin และ Kerven, 1980) หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย Flame Photometer ที่ความยาวคลื่น 589 และ 768 นาโนเมตร ตามลำดับ

ปริมาณคลอไรด์ (Cl^-) โดยวิธี dry ashing

1. นำตัวอย่างแห้งของพืชใส่ในถ้วยเผา เติม CaO จำนวน 2 ml เพื่อป้องกันการระเหิด
2. นำไปเผาในเตาเผา (muffle furnace) ที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที ทิ้งตัวอย่างให้เย็น
3. เติมน้ำกลั่น 10 ml และนำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที
4. กรองและล้างตะกอนบนกระดาษกรองหลายๆครั้งด้วยน้ำอุ่น
5. ปรับปริมาตรของสารละลายที่กรองได้ด้วยน้ำกลั่นใน Erlenmeryer flask ขนาด 50 ml
6. เก็บสารละลายที่ได้ไว้ในขวดพลาสติกขนาด 100 มล. ที่มีฝาปิด นำไปวิเคราะห์หาปริมาณคลอไรด์ โดยวิธี Mecuric thiocyanate method (Zall,1956) โดยนำสารละลายที่ได้มา 5 ml เติม Mecurric thiocyanate ($Hg(SCN_2)$) 0.4 ml เขย่าและเติม Ferric Ion (Fe^{3+})

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2 ml เขย่าให้เข้ากันและทิ้งไว้ 10 นาที

7. วัดความเข้มข้นสีน้ำตาลเหลืองด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร แล้วเปรียบเทียบความเข้มข้นกับกราฟมาตรฐานของคลอไรด์

หมายเหตุ กราฟมาตราฐานของคลอไรด์สามารถทำได้โดยวิธีการเดียวกัน

3.4.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ของข้อมูลตามแผนการทดลอง และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสิ่งทดลอง (treatment) โดยใช้ค่า Duncan's multiple range test (DMRT)