

### บทที่ 3

#### อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

##### 1. พืชทดลอง

เมล็ดถั่วดำ (*Vigna mungo* (L.) Hepper) ถั่วแดงหลวง (*Phaseolus vulgaris* L.) และถั่วเขียว (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) คราข้าวทอง (ดังภาพ 3.1)



ภาพ 3.1 ลักษณะเมล็ดพันธุ์ถั่วดำ (A) ถั่วแดงหลวง (B) และถั่วเขียว (C) ที่ใช้ปลูกเพื่อทำการทดลอง

##### 2. วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

###### เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. กล้องถ่ายรูป
2. เครื่องปั่นสาร
3. นาฬิกาจับเวลา
4. ตู้อบความร้อน (dry oven)
5. เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง
6. เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
7. เครื่องวัดการดูดกลืนคลื่นแสง (spectrophotometer)

### อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. ใบมีด
2. ลูกแก้ว
3. ผ้าปิดจมูก
4. มีดคัตเตอร์
5. ไม้บรรทัด
6. กระดาษทิชชู
7. ปิเปต 10 ml
8. กระดาษขึงสาร
9. ดินสอและปากกา
10. แท่งแก้วคนสาร (stirrer)
11. ปีกเกอร์ (beaker) 50 ml
12. หลอดทดลองขนาดกลาง
13. ถังมืออย่างสำหรับใช้แล้วทิ้ง
14. ซ้อนอะลูมิเนียมครึ่งวงกลม
15. กระบอกตวง (cylinder) 10 ml
16. ดินปลูกสวนเกษตรธรรมชาติแม่อน
17. กระดาษอะลูมิเนียมฟลอยด์ (aluminium foil)

### สารเคมี

1. น้ำกลั่น
2. dimethylsulfoxide (DMSO)

### 3. วิธีการทดลอง

นำเมล็ดพันธุ์ถั่วทั้ง 3 ชนิด จำนวน 100 กรัม มาแช่ด้วยน้ำประปา (tap water) เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นจึงเมล็ดที่อุณหภูมิห้องให้เมล็ดแห้ง นำเมล็ดมาเพาะในถุงดำ ขนาด 5x10 นิ้ว ที่มีดินผสม 1,050 กรัม โดยใช้เมล็ดพันธุ์จำนวน 8 กรัม ต่อดินผสม 1 ถู (ภาพ 3.2) ทำการเพาะเมล็ดจำนวน 48 ถูต่อพืช 1 ชนิด จากนั้นนำถุงเพาะไปวางในโรงเรือนเพาะชำ ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งมีอุณหภูมิ 34.2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 67.7 เปอร์เซ็นต์ รดน้ำทุกวันในปริมาณที่เท่ากันทุกถู คือ 250 มิลลิลิตร จนครบ 6 วันแล้วแบ่งกลุ่มพืชแต่ละชนิดที่ปลูกออกเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 16 ถู ดังนี้

|                                                                |                                                         |                |
|----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------|
| กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมรดน้ำปกติ (ชุดควบคุม)                    | รดน้ำทุกวัน                                             | เป็นเวลา 9 วัน |
| กลุ่มที่ 2 กลุ่มทดลองการขาดน้ำ (ชุดขาดน้ำ)                     | งดการให้น้ำ                                             | เป็นเวลา 9 วัน |
| กลุ่มที่ 3 กลุ่มทดลองการขาดน้ำ<br>แล้วรดน้ำกลับ (ชุดรดน้ำกลับ) | งดการให้น้ำนาน 6 วัน แล้วให้น้ำ<br>ต่อทุกวันจนครบ 3 วัน |                |

บันทึกผลการทดลองวันที่ 0, 3, 6 และ 9 โดยการวัดความสูงต่อต้น ซึ่งน้ำหนักสดต่อต้น ปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบี ในใบ ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ (relative water content ; RWC) ในใบ และความชื้นในดิน วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) กำหนดให้แต่ละชุดการทดลองที่วัดผลมีทั้งหมด 5 ซ้ำ



ภาพ 3.2 การเพาะเมล็ดถั่วทั้ง 3 ชนิด ในถุงดำขนาด 5 x 10 นิ้ว ในโรงเรือนเพาะชำ 2

#### การวัดความสูงและน้ำหนักสดต่อต้น

นำต้นถั่วแต่ละชนิดมาวัดความสูงของต้น โดยใช้ไม้บรรทัด (ภาพ 3.3) โดยวัดจากส่วนของลำต้นเหนือใบเลี้ยง (epicotyl) ถึงปลายยอด หน่วยที่ใช้วัดคือ เซนติเมตร (cm) โดยกำหนดให้มีจุดทศนิยม 1 ตำแหน่ง ส่วนการวัดน้ำหนักสดต่อต้น ใช้ใบมีดตัดบริเวณโคนของลำต้นเหนือใบเลี้ยง (epicotyl) มาชั่งน้ำหนักสดโดยใช้เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง หน่วยที่ใช้วัดคือ กรัม (g)



ภาพ 3.3 การวัดความสูงของลำต้นถั่วเขียว (ก) ถั่วแดงหลวง (ข) และถั่วดำ (ค)

#### การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

ดัดแปลงจากวิธีการของ Chappelle *et al.* (1992) นำใบถั่วแต่ละชนิด 1 กรัมแช่ในสารละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก ปิดปากหลอดทดลองด้วยกระดาษอะลูมิเนียมฟลอยด์ นำหลอดทดลองที่ได้ (ภาพ 3.4) ไปบ่มไว้ในที่มืด อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่สกัดได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ด้วย spectrophotometer โดยใช้ความยาวคลื่น 648 และ 664 นาโนเมตร และใช้สารละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นตัวปรับศูนย์ (blank) นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บี มีหน่วยเป็น ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ} = 12.25A_{664 \text{ nm}} - 2.79A_{648 \text{ nm}}$$

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี} = 21.50A_{648 \text{ nm}} - 5.10A_{664 \text{ nm}}$$



ภาพ 3.4 การแช่ใบถั่วในสารละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO)

#### การวัดปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบ (relative water content ; RWC)

ดัดแปลงจากวิธีการของ Gonzalez and Gonzalez-Vilar (2001) ด้วยการนำใบถั่วแต่ละชนิดมาตัดเป็นวงกลม (เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2.5 เซนติเมตร) โดยตัดให้ห่างจากโคนใบ 1 เซนติเมตร ตรงบริเวณกลางใบ (ภาพ 3.5) แล้วนำไปชั่งด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียดชนิด 4 ตำแหน่ง ค่าที่ได้เป็น field weight (FW)



ภาพ 3.5 ตำแหน่งการตัดใบถั่ว โดยตัดห่างจากโคนใบ 1 เซนติเมตร บริเวณกลางใบ

จากนั้นนำใบที่ตัดไปแช่ในน้ำกลั่นปริมาณ 5 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในหลอดทดลองขนาดเล็กที่ปิดปากหลอดทดลองด้วยลูกแก้วเพื่อป้องกันการระเหยของน้ำออกสู่ภายนอก (ภาพ 3.6) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วดึงใบมาชั่งน้ำหนักเพื่อวัดค่า turgid weight (TW) จากนั้นนำใบห่อด้วยกระดาษฟลอยด์ แล้วนำไปอบแห้งในตู้อบความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพ 3.7) นำใบที่แห้งแล้วมาชั่งน้ำหนักเพื่อวัดค่า dry weight (DW)



ภาพ 3.6 การแช่ใบในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร และปิดปากหลอดทดลองด้วยลูกแก้ว



ภาพ 3.7 ลักษณะใบที่อบด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

นำค่าที่วัดได้ทั้งหมดมาคำนวณหาปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบ โดยใช้สูตรดังนี้

$$RWC (\%) = [(FW - DW)/(TW - DW)] \times 100$$

#### การวัดปริมาณน้ำในดิน

ใช้วิธี gravimetric method (สหายรัตน์, 2534) โดยใช้ไม้บรรทัดวัดความสูงของถุงดำที่ใช้ปลูกถั่วให้สูงจากพื้นดินเป็นระยะ 5 เซนติเมตร แล้วใช้มีดคัดเตอร์ตัดหน้าดินออกให้อยู่ในแนวระดับเดียวกัน ใช้ช้อนอะลูมิเนียมครึ่งวงกลม (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5.5 เซนติเมตร) ตักดินและใช้ไม้บรรทัดเหล็กเกลี่ยดินออกให้เรียบเสมอขอบของช้อนอะลูมิเนียม (ภาพ 3.8)



(ก)

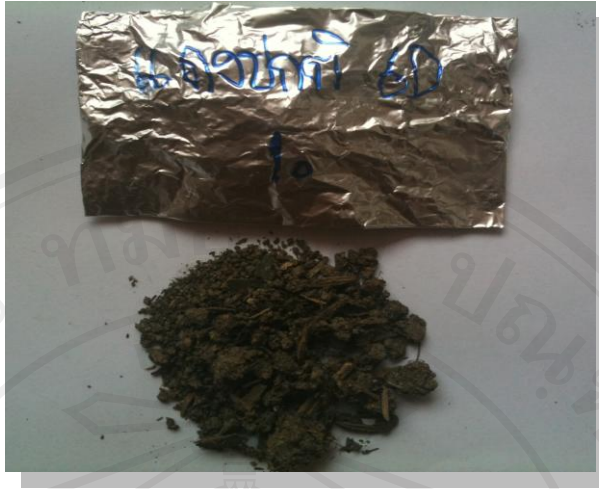


(ข)

ภาพ 3.8 ความลึกของดินในถุงปลูก (ก) และตัวอย่างดินที่นำมาใช้ในการทดลองหาปริมาณน้ำในดิน (ข)

นำตัวอย่างดินที่ตักได้ไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักเพื่อวัดค่า field weight (FW) จากนั้นห่อตัวอย่างดินนี้ด้วยกระดาษฟลอยด์ แล้วนำไปอบในตู้อบความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพ 3.9) นำตัวอย่างดินที่แห้งมาชั่งน้ำหนักเพื่อวัดค่า dry weight (DW) แล้วนำตัวเลขที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณน้ำในดิน ตามสูตรดังนี้

$$\text{ปริมาณน้ำในดิน } (\%) = [(FW - DW)/DW] \times 100$$



ภาพ 3.9 ลักษณะดินที่อบด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง