การใช้คลอโรฟิลล์มิเตอร์ประเมินระดับคลอโรฟิลล์และไนโตรเจนในใบส้มโอ

Estimation of Chlorophyll and Nitrogen Levels in Pummelo Leaves by Chlorophyll Meter

สิริมาส วงศ์สุบรรณ, [1] กฤษณา กฤษณพุกต์ [1] และลพ ภวภูตานนท์ [1]*

Sirimas Vongsubun,[1*] Krisana Krisanapook[1] and Lop Phavaphutanon[1]

ABSTRACT

The relationship between leaf greenness values (SPAD) measured by chlorophyll meter (Minolta SPAD - 502) and extracted chlorophyll concentration and the possibility to estimate leaf nitrogen status of pummelo by using chlorophyll meter were studied. 'Thong Dee' pummelo plants were fertilized with different rates of nitrogen and their leaves were sampled at different ages to determine the degree of leaf greenness, extracted chlorophyll concentration and total nitrogen concentration. The results showed that leaf greenness values, total chlorophyll concentration and total nitrogen concentration of leaf samples were in the range of 22.8 to 91.0 SPAD - unit, 0.01 to 0.10 mg Chl/cm^2 and 1.90 – 4.22 %N, respectively. The ratio of chlorophyll a to chlorophyll b remained relatively stable with increased total chlorophyll concentration. The relationship between the degree of leaf greenness and extracted chlorophyll concentration on leaf area and leaf fresh weight basis was described as a quadratic equation: Chl_{total} (mg/cm^2) = $0.00002SPAD^2 - 0.0009SPAD + 0.0303$ (R^2 = 0.89, *p*-value < 0.0001) and Chl_{total} (mg/g FW) = $0.00039SPAD^2 - 0.0243SPAD + 0.9867$ (R^2 = 0.74, *p*-value < 0.0001). Leaf total chlorophyll concentration had a linear relationship with leaf nitrogen concentration as followed; N (%) = $13.4550Chl_{total} + 1.9946$ (R^2 = 0.24, *p*-value < 0.0001). The relationship between the degree of leaf greenness and nitrogen concentration was described as a quadratic equation: N (%) = $0.0008SPAD^2 - 0.0886SPAD + 4.3996$ (R^2 = 0.53, *p*-value < 0.0001).

Key words: pummelo, chlorophyll meter and nitrogen concentration

บทคัดย่อ

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเขียวใบ (SPAD) ที่วัดด้วยคลอโรฟิลล์มิเตอร์ (Minolta SPAD 502) กับความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ที่สกัดได้ และความเป็นไปได้ในการใช้ค่าความเขียวใบประเมินระดับไนโตรเจน (N) ในใบของส้มโอ โดยใช้ตัวอย่างใบอายุต่างๆ กันจากต้นส้มโอพันธุ์ทองดีที่ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างๆ พบว่าตัวอย่างใบที่ศึกษามีค่าความเขียวใบ ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์รวมที่สกัดได้ (Chl_{total}) และความเข้มข้นของไนโตรเจนในใบอยู่ในช่วงระหว่าง 22.8 – 91.0 SPAD - unit 0.01 - 0.10 มก. คลอโรฟิลล์/ซม.^{2} และ 1.90 - 4.22

[1*] ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

[*] Corresponding author: Tel.08-6689-1492, E-mail address: sirimas23@hotmail.com

%N ตามลำดับ อัตราส่วนระหว่างคลอโรฟิลล์เอต่อคลอโรฟิลล์บี มีค่าค่อนข้างคงที่เมื่อความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์รวมที่สกัดได้เพิ่มขึ้น ค่าความเขียวใบ และความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์รวมต่อหน่วยพื้นที่ใบและต่อหน่วยน้ำหนักสดใบมีความสัมพันธ์ที่แสดงด้วยสมการ quadratic คือ Chl_{total} (มก./ซม.^{2}) = 0.00002SPAD^2 – 0.0009SPAD + 0.0303 (R^2 = 0.89, *p*-value < 0.0001) และ Chl_{total} (มก./ก.น้ำหนักสด) = 0.00039SPAD^2 – 0.0243SPAD + 0.9867 (R^2 = 0.74, *p*-value < 0.0001) ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์รวมต่อหน่วยพื้นที่ใบกับระดับไนโตรเจนในใบมีความสัมพันธ์ที่แสดงด้วยสมการเส้นตรงคือ N (%) = 13.4550Chl_{total} + 1.9946 (R^2 = 0.24, *p*-value < 0.0001) ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเขียวใบกับระดับไนโตรเจนในใบ แสดงด้วยสมการ quadratic ดังนี้ N (%) = 0.0008SPAD^2 – 0.0886SPAD + 4.3996 (R^2 = 0.53, *p*-value < 0.0001)

คำสำคัญ: สัมโอ คลอโรฟิลล์มิเตอร์ และความเข้มข้นไนโตรเจน

คำนำ

คลอโรฟิลล์มิเตอร์เป็นเครื่องมือที่ใช้ประเมินความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ในใบพืชอย่างรวดเร็ว สามารถวัดผลได้ทันทีในสภาพแปลงโดยไม่ต้องทำลายตัวอย่าง (nondestructive method) คลอโรฟิลล์มิเตอร์ Minolta SPAD 502 มีหลักการทำงานโดยเครื่องจะวัดแสงในช่วงความยาวคลื่นจำเพาะคือ 600 – 700 นาโนเมตร และ 400 – 500 นาโนเมตร ที่ส่องผ่านแผ่นใบพืช ซึ่งรงควัตถุคลอโรฟิลล์สามารถดูดซับแสงในช่วงความยาวคลื่นดังกล่าวได้ดี ค่าที่อ่านได้ผันแปรตามความเขียวของใบ (SPAD) และมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ในใบพืช กำหนดให้มีหน่วยเป็น SPAD – unit (Loh *et al*., 2002) การทดสอบในพืชหลายชนิดยืนยันความสัมพันธ์ที่มีนัยสำคัญสูงระหว่างค่าความเขียวใบและปริมาณคลอโรฟิลล์รวมในใบที่สกัดได้ (พูนพิภพ และคณะ, 2537; Yavada, 1986; Schaper and Chacko, 1991; Wood *et al*., 1993) อย่างไรก็ตาม ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเขียวใบกับความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ที่สกัดได้มีความจำเพาะในพืชแต่ละชนิด และผันแปรไปตามสภาพแวดล้อม ปริมาณธาตุอาหารที่ได้รับ อายุใบ ความหนาของใบ และช่วงเวลาในรอบปีที่ทำการวัด (Altland *et al.,* 2003; Jifon *et al*., 2005) จึงจำเป็นต้องสร้างกราฟและสมการความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเขียวใบกับความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ที่สกัดได้ของพืชแต่ละชนิด ในสภาพแวดล้อมที่กำหนด เพื่อเป็นเกณฑ์ในการประเมินความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ในใบพืชด้วยเครื่องคลอโรฟิลล์มิเตอร์

ธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญของคลอโรฟิลล์ และโดยทั่วไปปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับไนโตรเจนในใบ และความสามารถในการสังเคราะห์แสงของพืช (Evans, 1989) จึงมีความเป็นไปได้ในการใช้เครื่องคลอโรฟิลล์มิเตอร์ประเมินระดับไนโตรเจนในใบได้อย่างรวดเร็วและสามารถจัดการให้ปุ๋ยไนโตรเจนกับพืชได้อย่างเหมาะสมและทันกับความต้องการ ตัวอย่างพืชที่ให้ค่าความสัมพันธ์สูงระหว่างค่าความเขียวใบกับความเข้มข้นของไนโตรเจนในใบ เช่น ข้าวสาลี (Uddling *et al.,* 2007) กาแฟ (Netto *et al*., 2004) ถั่วเหลือง อ้อย (พูนพิภพ และคณะ, 2537) แต่ก็มีรายงานในพืชบางชนิดว่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเขียวใบกับความเข้มข้นของไนโตรเจนในใบแม้จะมีนัยสำคัญ แต่ให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของสมการความสัมพันธ์ค่อนข้างต่ำ เช่น Benjamin Fig (R^2 = 0.32) (Loh *et al.,* 2002) และ sweet gum (R^2 = 0.37) (Chang and Robinson, 2003) หรือในพืชบางชนิด เช่น maple บางพันธุ์ไม่พบความสัมพันธ์ที่เด่นชัด (Sibley *et al.,* 1996) การศึกษาในพืชตระกูลส้มหลายชนิดในต่างประเทศพบว่า ค่าความเขียวใบมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับไนโตรเจนในใบอย่างมีนัยสำคัญแต่มีความผันแปรไปตามชนิด

ของส้ม ความหนาของใบ ช่วงเวลาในรอบปีที่ทำการวัด สภาพการปลูกเลี้ยง และปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนที่ได้รับ และได้เสนอสมการเชิงเส้นในการประเมินระดับไนโตรเจนจากค่าความเขียวใบ ที่วัดด้วยเครื่องคลอโรฟิลล์มิเตอร์ (Li *et al.,* 1998; Jifon *et al.,* 2005) การศึกษาในส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งพบความสัมพันธ์ที่มีนัยสำคัญระหว่างค่าความเขียวใบกับระดับไนโตรเจนในใบ แต่มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของสมการความสัมพันธ์ค่อนข้างต่ำ (Jaroonchon *et al*., 2010) สำหรับส้มโอพันธุ์ทองดีซึ่งเป็นพันธุ์การค้าที่สำคัญของประเทศไทย การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเขียวใบกับความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ที่สกัดได้ และความเข้มข้นของไนโตรเจนในใบ ยังไม่มีรายงานไว้

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเขียวใบที่วัดด้วยเครื่องคลอโรฟิลล์มิเตอร์กับปริมาณคลอโรฟิลล์ที่สกัดได้และระดับไนโตรเจนในใบ และความเป็นไปได้ในการประเมินสภาวะของไนโตรเจนในใบส้มโอพันธุ์ทองดีอย่างรวดเร็วด้วยคลอโรฟิลล์มิเตอร์ โดยใช้ตัวอย่างใบระยะต่างๆ กันจากต้นส้มโอที่ได้รับปุ๋ยไนโตรเจนในอัตราต่างๆ เพื่อให้มีระดับคลอโรฟิลล์และไนโตรเจนในใบกระจายตัวในช่วงกว้าง

อุปกรณ์และวิธีการ

ใช้ต้นส้มโอพันธุ์ทองดีอายุ 3 ปี ที่สมบูรณ์และมีขนาดใกล้เคียงกันจำนวน 20 ต้น ซึ่งปลูกในกระถางพลาสติกขนาด 0.06 ลบ.ม. เป็นตัวแทนในการศึกษา แบ่งต้นส้มโอเป็น 3 กลุ่ม ให้สารละลายธาตุอาหาร Long Ashton Nutrient Solution (Hewitt, 1966) ที่ระดับไนโตรเจนต่างกันคือ กลุ่มที่ 1 ให้สารละลายธาตุอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน ต้นละ 1 ล. สัปดาห์ละครั้ง กลุ่มที่ 2 ให้สารละลายธาตุอาหารที่มีไนโตรเจน 140 มก./ล. (ความเข้มข้นปกติของไนโตรเจนในสารละลายธาตุอาหารชนิดนี้) ต้นละ 1 ล. ในสัปดาห์แรกของทุกเดือน ส่วนในสัปดาห์ที่ 2 3 และ 4 ให้สารละลายธาตุอาหารเหมือนกลุ่มที่ 1 และในกลุ่มที่ 3 ให้สารละลายธาตุอาหารที่มีไนโตรเจน 176 มก./ล. ต้นละ 1 ล. สัปดาห์ละครั้ง และพ่นสารละลายปุ๋ยยูเรียความเข้มข้น 1 % เสริมทางใบ สัปดาห์ละครั้ง ส่งผลให้ต้นส้มโอแต่ละกลุ่มมีระดับไนโตรเจนในใบแตกต่างกัน

การวัดค่าความเขียวใบ

วัดค่าความเขียวใบของใบที่อยู่ในระยะใบอ่อน แผ่นใบมีสีเขียวอ่อน ระยะใบขยายขนาดเต็มที่และระยะใบแก่จัดแผ่นใบมีสีเขียวเข้มจากกิ่งปลายยอดที่สมบูรณ์ซึ่งมี 8-16 ใบต่อยอด ใช้ตัวอย่างใบไม่น้อยกว่า640 ใบ ในแต่ละระยะใบของต้นส้มโอทั้ง 3 กลุ่ม ด้วยเครื่องคลอโรฟิลล์มิเตอร์ (Minolta SPAD-502, Japan) ขณะที่ใบอยู่บนต้น เพื่อให้ได้ค่าความเขียวใบที่มีการกระจายตัวในช่วงกว้าง วัดค่าจากสองตำแหน่งในแต่ละใบแล้วคำนวณค่าเฉลี่ย ทำเครื่องหมายในตำแหน่งที่ทำการวัดค่าความเขียวใบเพื่อเจาะชิ้นส่วนใบในตำแหน่งดังกล่าวนำไปสกัดวิเคราะห์คลอโรฟิลล์ในห้องปฏิบัติการต่อไป

การสกัดและวิเคราะห์ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์รวม คลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บีในใบ

หลังจากวัดค่าความเขียวใบแล้ว เก็บตัวอย่างใบจากต้น นำมาเจาะด้วย cork borer ตรงตำแหน่งที่ใช้เครื่องคลอโรฟิลล์มิเตอร์วัดค่าความเขียวใบ ได้เป็นชิ้นส่วนแผ่นใบวงกลม (leaf disc) ซึ่งมีพื้นที่ 0.82 ตร.ซม.ชั่งน้ำหนักสด ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง นำ leaf disc ใส่หลอดแก้วที่เติมสารละลาย N,N-dimethylformamide (DMF) ความเข้มข้น 99.8 % ปริมาตร 4 มล. ปิดฝาให้สนิทแล้วเก็บไว้ในที่มืดทันทีเป็นเวลา 5 วัน เพื่อสกัดคลอโรฟิลล์และป้องกันมิให้คลอโรฟิลล์ที่สกัดได้ถูกทำลาย นำสารละลายสีเขียวใสที่สกัดได้ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Milton Roy, Speactonic Genesys 5, USA.) ที่ความยาวคลื่น 647 และ 664 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย DMF เป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์เอ (Chl_a) คลอโรฟิลล์บี (Chl_b) และคลอโรฟิลล์รวม (Chl_{total})

ในใบจากสมการที่เสนอโดย Moran (1982) แสดงผลเป็นความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ต่อหน่วยพื้นที่ใบ (มก./ซม.^{2}) และความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ต่อหน่วยน้ำหนักสด (มก./ก. น้ำหนักสด)

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของธาตุไนโตรเจนในใบ

รวมแผ่นใบที่เหลือจากการเจาะด้วย cork borer ไปล้างด้วยกรดไฮโดรคลอริค ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล และน้ำกลั่น จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 70 °ซ เป็นเวลา 48 - 72 ชั่วโมง แล้วบดให้ละเอียด ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 40 เมช แล้วนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนโตรเจนรวม ด้วยวิธี Combustion ด้วยเครื่อง Protein/nitrogen determinator (LECO, FP-528, Miami, USA) โดยใช้ Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ซึ่งทราบระดับไนโตรเจนที่แน่นอนเป็นสารมาตรฐาน

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเขียวใบกับความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์รวมในใบที่สกัดได้ ความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนของคลอโรฟิลล์เอต่อคลอโรฟิลล์บี ($Chl_{a/b}$ ratio) กับความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์รวม ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์รวมในใบที่สกัดได้กับระดับไนโตรเจนในใบ และความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเขียวใบกับระดับไนโตรเจนในใบ โดยการวิเคราะห์ความถดถอย (SAS Institute, 1989)

ผลและวิจารณ์

ใบส้มโอพันธุ์ทองดีระยะใบอ่อน ใบขยายขนาดเต็มที่ และใบแก่จัด จากต้นที่ได้รับไนโตรเจนระดับต่างๆ มีค่าความเขียวใบกระจายในช่วงกว้าง ระหว่าง 22.8 – 91.0 SPAD – unit และไม่พบใบที่แสดงอาการขาดไนโตรเจนในกลุ่มที่ไม่ได้ให้ปุ๋ยไนโตรเจนระหว่างการทดลอง ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์รวมที่สกัดได้มีค่ากระจายในช่วงกว้างเช่นเดียวกันคือ ระหว่าง 0.01 - 0.10 มก./ซม.^{2} ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเขียวใบกับความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์รวมต่อหน่วยพื้นที่ใบ และกับความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์รวมต่อหน่วยน้ำหนักสดของใบมีลักษณะเป็นเส้นโค้ง (Figure 1 - 2) และมีค่าความชันของเส้นกราฟ (slope) เพิ่มมากขึ้นเมื่อค่าความเขียวใบมากกว่า 50 SPAD – unit แสดงว่าในช่วงดังกล่าวเมื่อคลอโรฟิลล์รวมที่สกัดได้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ค่าความเขียวใบที่อ่านได้จากเครื่องคลอโรฟิลล์มิเตอร์เพิ่มขึ้นตามในสัดส่วนที่น้อยกว่า อาจเกิดจากมีการกระจายตัวของคลอโรฟิลล์ในแผ่นใบไม่สม่ำเสมอ หรืออาจเกิดจากการกระเจิงของแสงหลายครั้งภายในแผ่นใบ (Uddling *et al*., 2007) โดยเฉพาะในใบพืชที่หนารวมถึงใบส้มโอ ลักษณะความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเขียวใบกับความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์รวมแบบเส้นโค้งนี้ มีรายงานในพืชชนิดอื่นๆ ได้แก่ ถั่วเหลือง อ้อย มะม่วง มะนาว และส้มโอไม่ระบุพันธุ์ (พูนพิภพ และคณะ, 2537) สมการความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเขียวใบกับความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์รวมให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ที่สูงขึ้นเมื่อใช้ค่าความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์รวมต่อหน่วยพื้นที่ใบ จึงเสนอสมการการประเมินความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์รวมต่อหน่วยพื้นที่ใบที่สกัดได้ของใบส้มโอพันธุ์ทองดีจากค่าความเขียวใบ (SPAD) ที่วัดด้วยเครื่องคลอโรฟิลล์มิเตอร์ (Minolta SPAD 502) ดังนี้

คลอโรฟิลล์รวมต่อหน่วยพื้นที่ (มก./ซม.^{2}) = $0.00002SPAD^2 - 0.0009SPAD + 0.0303$ (1)

($R^2 = 0.89$, p-value < 0.0001)

ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์รวมเป็นผลรวมของคลอโรฟิลล์เอและคลอโรฟิลล์บี พบว่าอัตราส่วนระหว่างคลอโรฟิลล์เอต่อคลอโรฟิลล์บี ($Chl_{a/b}$ ratio) มีค่าค่อนข้างคงที่ตลอดช่วงความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์รวมที่วัดได้ แสดงให้เห็นว่าปริมาณคลอโรฟิลล์เอและคลอโรฟิลล์บีเพิ่มไปด้วยกันเมื่อปริมาณคลอโรฟิลล์รวมเพิ่มขึ้น (Figure

3) โดยทั่วไป ใบพืชที่สมบูรณ์และได้รับแสงเต็มที่มีค่าเฉลี่ยของ $Chl_{a/b}$ ประมาณ 3.1 (Lichtenthaler *et al.,* 1981) การขาดไนโตรเจนส่งผลให้มีปริมาณคลอโรฟิลล์รวมต่ำลง และมีการแบ่งไนโตรเจนไปยัง Photosystem II (PSII) ซึ่งมีคลอโรฟิลล์เอเป็นองค์ประกอบหลักเพิ่มขึ้น ขณะที่การแบ่งไนโตรเจนไปยัง Light harvesting protein complex (LHCII) ซึ่งมีคลอโรฟิลล์บีเป็นองค์ประกอบหลักยังคงเป็นปกติ ทำให้ $Chl_{a/b}$ มีค่าเพิ่มขึ้นในภาวะที่พืชได้รับไนโตรเจนลดลง แต่ปรากฏการณ์นี้เห็นผลไม่เด่นชัดในสภาพที่ใบพืชได้รับแสงน้อย (Kitajima and Hogan, 2003) ในการศึกษาครั้งนี้ แม้ว่าค่า $Chl_{a/b}$ จะผันแปรระหว่าง 1.93 - 5.54 (Figure 3) แต่ไม่พบว่า $Chl_{a/b}$ มีค่าเพิ่มขึ้นเด่นชัดโดยเฉพาะเมื่อคลอโรฟิลล์รวมในใบมีค่าต่ำเช่นที่เคยมีรายงานมาก่อน (Netto *et al.*, 2005; Kitajima and Hogan, 2003) ซึ่งอาจเป็นเพราะตัวอย่างใบจากต้นส้มโอที่ได้รับไนโตรเจนน้อยไม่ได้แสดงอาการขาดธาตุอาหาร ใบยังคงเป็นสีเขียว และใบที่มีระดับคลอโรฟิลล์รวมต่ำส่วนหนึ่งเป็นใบที่ยังมีอายุน้อย รวมทั้งผลจากการใช้ตัวอย่างใบทั้งที่ได้รับแสงเต็มที่บริเวณปลายยอดและใบที่ได้รับแสงน้อยกว่าในบริเวณถัดจากปลายยอดลงมาหรือใบที่อยู่ภายในทรงพุ่ม ทั้งนี้มีรายงานว่าในสภาพที่ได้รับแสงมาก $Chl_{a/b}$ อาจเพิ่มขึ้นไปอยู่ในช่วง 3.2 - 4.0 แต่ถ้าได้รับแสงน้อย ค่า $Chl_{a/b}$ จะลดลงมาอยู่ในช่วง 2.5 - 2.9 เนื่องจากคลอโรฟิลล์เอสลายตัวได้ง่ายกว่าคลอโรฟิลล์บีในสภาพที่ได้รับแสงน้อย (Wolf, 1956)

ความเข้มข้นของไนโตรเจนในใบส้มโอพันธุ์ทองดีระยะต่างๆ ที่ได้รับไนโตรเจนต่างกัน มีค่าอยู่ในช่วง 1.90 - 4.22 % โดยกลุ่มที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนต่ำมาจากใบอายุน้อยและใบจากกลุ่มที่ไม่ได้ให้ธาตุไนโตรเจนเพิ่ม แต่ไม่พบตัวอย่างใบที่แสดงอาการขาดธาตุอาหารไนโตรเจนชัดเจนซึ่งอาจเป็นเพราะดินที่ใช้ปลูกพืชทดลองมีระดับไนโตรเจนมากเพียงพอตั้งแต่เริ่มต้น การงดให้ปุ๋ยไนโตรเจนจึงยังไม่ส่งผลทันทีและต้นส้มโออาจมีความสามารถในการเคลื่อนย้ายไนโตรเจนที่สะสมไว้ในส่วนต่างๆ ของต้นมายังใบระหว่างช่วงที่ทำการทดลอง เช่นเดียวกับที่พบในพืชยืนต้นหลายชนิด ส่วนกลุ่มที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนในใบสูง มาจากกลุ่มตัวอย่างใบที่มีอายุมาก และได้รับปุ๋ยไนโตรเจนเสริม พบว่า ค่าความเข้มข้นของไนโตรเจนในใบ (N) และความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์รวมต่อหน่วยพื้นที่ใบ (มก./ซม.^{2}) มีความสัมพันธ์กันแบบเส้นตรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Figure 4) แสดงด้วยสมการดังนี้

$$N\ (\%) = 13.4550 Chl_{total} + 1.9946 \quad (2)$$

($R^2 = 0.24$, *p-value* < 0.0001)

ค่าความเขียวใบกับความเข้มข้นของไนโตรเจนในใบส้มโอพันธุ์ทองดี มีความสัมพันธ์เป็นแบบเส้นโค้ง (Figure 5) แต่ให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของสมการความสัมพันธ์ค่อนข้างต่ำ สอดคล้องกับที่มีรายงานในส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง (Jaroonchon *et al*., 2010) ซึ่งมีสมการความสัมพันธ์แบบ quadratic ระหว่างค่าความเขียวใบกับความเข้มข้นของไนโตรเจนในใบที่คล้ายคลึงกัน ส่วนรายงานการศึกษากับส้มชนิดต่างๆ พบว่ามีสมการความสัมพันธ์ที่แตกต่างกัน และสมการความสัมพันธ์ของส้มชนิดหนึ่งๆ ยังผันแปรไปตามสภาพแวดล้อมที่ได้รับด้วย (Jifon *et al.,* 2005) พบความสัมพันธ์ที่มีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างค่าความเขียวใบกับระดับไนโตรเจนในใบ แต่มีค่า R^2 ของสมการความสัมพันธ์ค่อนข้างต่ำในไม้ยืนต้นบางชนิด เช่น sweet gum (R^2 = 0.37) sycamore (R^2 = 0.57) swamp cottonwood (R^2 = 0.32) และ green ash (R^2 = 0.72) แม้ว่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเขียวใบกับความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์รวมในใบพืชทดสอบเหล่านี้จะมีค่าสูงมากก็ตาม

(Chang and Robinson, 2003) โดยทั่วไป ระดับไนโตรเจนในใบมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบและอัตราการสังเคราะห์แสงของพืช เนื่องจากไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของคลอโรฟิลล์และเอนไซม์ที่จำเป็นต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง (Evans, 1989) แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ความสัมพันธ์ระหว่างระดับไนโตรเจน และปริมาณคลอโรฟิลล์รวมในใบ และความสัมพันธ์ระหว่างระดับไนโตรเจนกับค่าความเขียวใบของส้มโอพันธุ์ทองดี มีค่า R^2 ของสมการความสัมพันธ์ค่อนข้างต่ำ ซึ่งอาจเป็นเพราะการวัดค่าความเขียวใบเป็นการประเมินไนโตรเจนในส่วนที่เกี่ยวข้องกับคลอโรฟิลล์ ขณะที่ไนโตรเจนในใบพืชอีกส่วนหนึ่งอยู่ในรูปโปรตีนที่ละลายน้ำได้และไม่ได้ทำหน้าที่ในการดูดซับแสง (Evans, 1989) และการใช้ตัวอย่างใบส้มโอที่มีอายุที่หลากหลาย ในช่วงการพัฒนาหนึ่งๆ ไนโตรเจนในใบอาจสะสมในรูปไนเตรท และไม่ได้เป็นองค์ประกอบของคลอโรฟิลล์ (Loh, *et al.,* 2002) นอกจากนี้การเคลื่อนย้ายของไนโตรเจนระหว่างแหล่งสะสม (source) และแหล่งใช้ (sink) ในพืชยืนต้น รวมถึงส้มโอ มีความซับซ้อนกว่าในพืชล้มลุก (Wood *et al.,* 1993)

ผลการศึกษาในครั้งนี้ แสดงถึงความเป็นไปได้ในการประเมินระดับไนโตรเจน (N) ในใบส้มโอพันธุ์ทองดีอย่างรวดเร็วแบบไม่ทำลายตัวอย่าง โดยใช้เครื่องคลอโรฟิลล์มิเตอร์ร่วมกับสมการความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเขียวใบ (SPAD) กับความเข้มข้นของไนโตรเจนในใบดังนี้

$$N\ (\%) = 0.0008SPAD^2 - 0.0886SPAD + 4.3996 \quad (3)$$

($R^2 = 0.53$, p-value < 0.0001)

สรุปผลการทดลอง

ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเขียวใบ (SPAD) ที่วัดด้วยเครื่องคลอโรฟิลล์มิเตอร์ (Minolta SPAD 502) กับความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์รวม (Chl_{total}) ต่อหน่วยพื้นที่ใบ (มก./ซม.^{2}) และกับความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์รวม (Chl_{total}) ต่อหน่วยน้ำหนักสดของใบ (มก./ก. น้ำหนักสด) ที่สกัดคลอโรฟิลล์ด้วยสารละลาย N,N-Dimethylformamide (DMF) มีลักษณะเป็นเส้นโค้ง โดยสมการประเมินความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์รวมต่อหน่วยพื้นที่ใบจากค่าความเขียวใบให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ที่สูงกว่า ซึ่งแสดงในรูปสมการ quadratic โพลิโนเมียล ดังนี้ Chl_{total} (มก./ซม.^{2}) = $0.00002SPAD^2 - 0.0009SPAD + 0.0303$ ($R^2 = 0.89$, p-value < 0.0001) สมการประเมินความเข้มข้นไนโตรเจน (N) ในใบ จากความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์รวมที่สกัดได้ มีลักษณะเป็นเส้นตรง แสดงในรูปสมการเส้นตรงดังนี้ $N\ (\%) = 13.4550Chl_{total} + 1.9946$ ($R^2 = 0.24$, p-value < 0.0001) และความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเขียวใบกับความเข้มข้นไนโตรเจนในใบส้มโอพันธุ์ทองดี แสดงด้วยสมการ quadratic ดังนี้ $N\ (\%) = 0.0008SPAD^2 - 0.0886SPAD + 4.3996$ ($R^2 = 0.53$, p-value < 0.0001)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และโครงการศูนย์ความเป็นเลิศทางวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

พูนพิภพ เกษมทรัพย์, พัชรียา บุญกอแก้ว, เจษฎา ภัทรเลอพงษ์, เพ็น สายขุนทด และ รวี เสรฐภักดี. 2537. การประเมินปริมาณคลอโรฟิลล์จากความเขียวใบพืชบางชนิดในประเทศไทย, น. 144-129. *ใน* การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 32. สาขาพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

Altland, J. E., C. H. Gilliam, G. J. Keever, J.H. Edwards, J.L. Sibley and D.C. Fare. 2003. Rapid determination of nitrogen status in pansy. HortSci. 38: 537-541.

Chang, S. X. and D. J. Robinson. 2003. Nondestructive and rapid estimation of hardwood foliar nitrogen status using the SPAD-502 chlorophyll meter. For. Ecol. Mange.181: 331-338.

Evans, J.R. 1989. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C_3 plants. Oecologia 78: 9 -19.

Hewitt, E. J., 1966. Sand and Water Culture Methods Used in the Study of Plant Nutrition. 2nd Edition. Commonwealth Agricultural Bureau, Farnham Royal, Bucks.

Jaroonchon, A., K. Krisanapook, and L. Phavaphutanon. 2010. Correlation between pummelo leaf nitrogen concentrations determined by combustion method and kjeldahl method and their relationship with SPAD values from portable chlorophyll meter. Kasetsart J. (Nat. Sci.) 44: 800-807.

Jifon, J. L., J. P. Syvertsen and E. Whaley. 2005. Growth environment and leaf anatomy affect nondestructive estimates of chlorophyll and nitrogen in *Citrus* sp. leaves. J. Amer. Soc. HortSci. 130: 152-158.

Kitajima, K. and K. P. Hogan. 2003. Increases of chlorophyll *a*/*b* ratios during acclimation of tropical woody seedlings to nitrogen limitation and high light. Plant, Cell Environ. 26: 857-865.

Li, Y. C., A. K. Alva, D. W. Calvert and M. Zhang. 1998. A rapid nondestructive technique to predict leaf nitrogen status of grapefruit tree with various nitrogen fertilization practices. HortTech. 8:81-86.

Lichtenthaler, H. K., C. Buschmann, M. Doll, H. J. Fietz, T. Bach, U. Kozel, D. Meir and U. Rahmsdorf. 1981. Photosynthetic activity chloroplasts ultrastructure and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. Photosynth. Res. 2: 115-141.

Loh, F. C. W., J. C. Grabosky and N. L. Bassuk. 2002. Using the SPAD 502 meter to assess chlorophyll and nitrogen content of Benjamin fig and cottonwood leaves. HortTech. 12: 682-686.

Moran, R. 1982. Formulae for determination of chlorophyllous pigments extracted with N,N-dimethylformamide. Plant Physiol. 69: 1376-1381.

SAS Institute. 1989. SAS/Stat User's Guide, version 6, vol.2, 4th Edition. SAS Institute, Cary, NC.

Schaper, H. and E. K. Chacko. 1991. Relation between extractable chlorophyll and portable chlorophyll meter readings in leaves of eight tropical and subtropical fruit-tree species. J. Plant Physiol. 138: 674-677.

Sibley, J. F., D. J. Eakes, C. H. Gilliam, G. L. Keever, W. A. Dozier and D. G. Himelrick. 1996. Foliar SPAD-502 meter values, nitrogen levels and extractable chlorophyll for red maple selections. HortSci. 31: 468-470.

Netto, A. T., E. Campostrini, J. G. de Oliveira and E. R. Bressan-Smith. 2005. Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. Scientia Hort. 104: 199-209.

Uddling, J., J. G. Alfredsson, K. Piikki and H. Pleijel. 2007. Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. Photosynth. Res. 91:37-46.

Wolf, F.T. 1956. Change in chlorophyll *a* and *b* in autumn leaves. Am. J. Bot. 43: 714-718.

Wood, C. W., D. W. Reeves and D. G. Himelrick. 1993. Relationship between chlorophyll meter reading and leaf chlorophyll concentration, N status and crop yield: A review. Proc. Agron. Soc. N.Z. 23:1-9.

Yavada, U. L. 1986. A rapid and nondestructive method to determine chlorophyll in intact leaves. HortSci. 21:1148-1150.

Received 28 June 2012

Accepted 28 December 2012

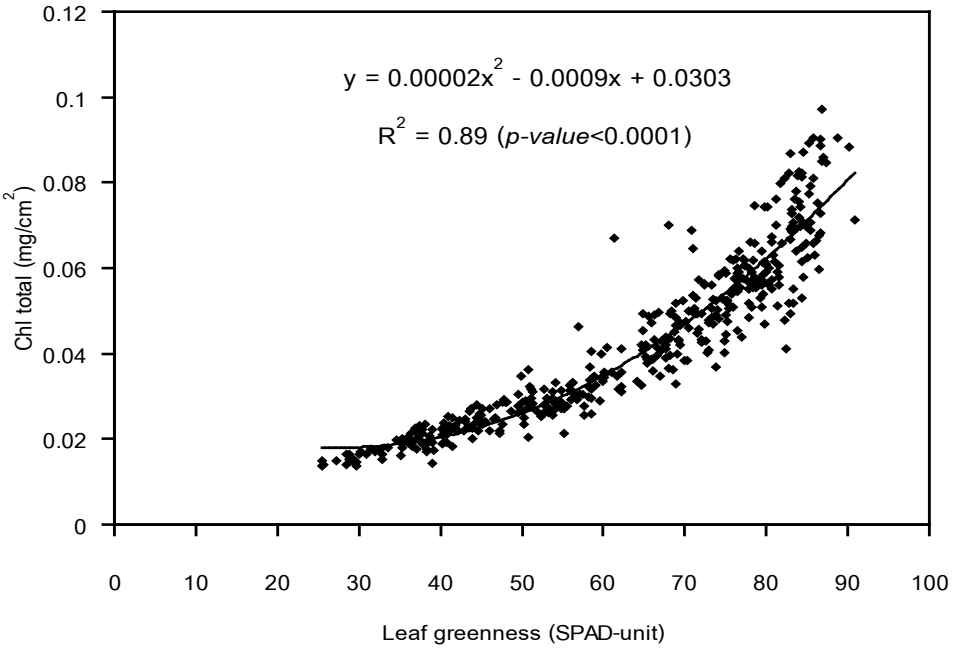

Figure 1 Relationship between the degree of leaf greenness and extracted chlorophyll concentration (mg/cm^2) on leaf area basis of 'Thong Dee' pummelo leaves.

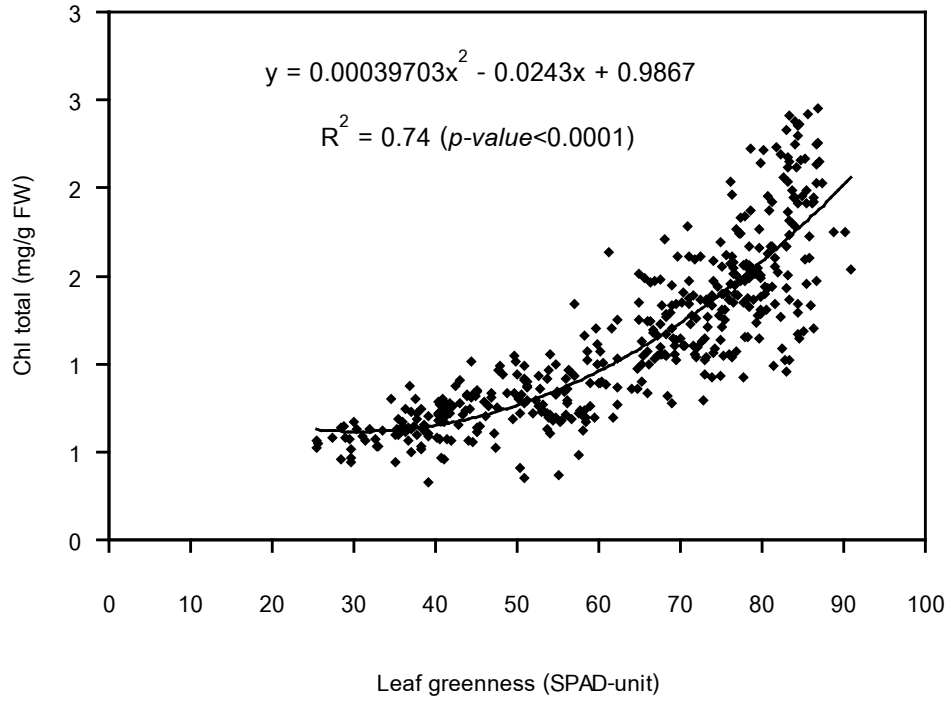

Figure 2 Relationship between the degree of leaf greenness and extracted chlorophyll concentration (mg/g FW) on leaf fresh weight basis of 'Thong Dee' pummelo leaves.

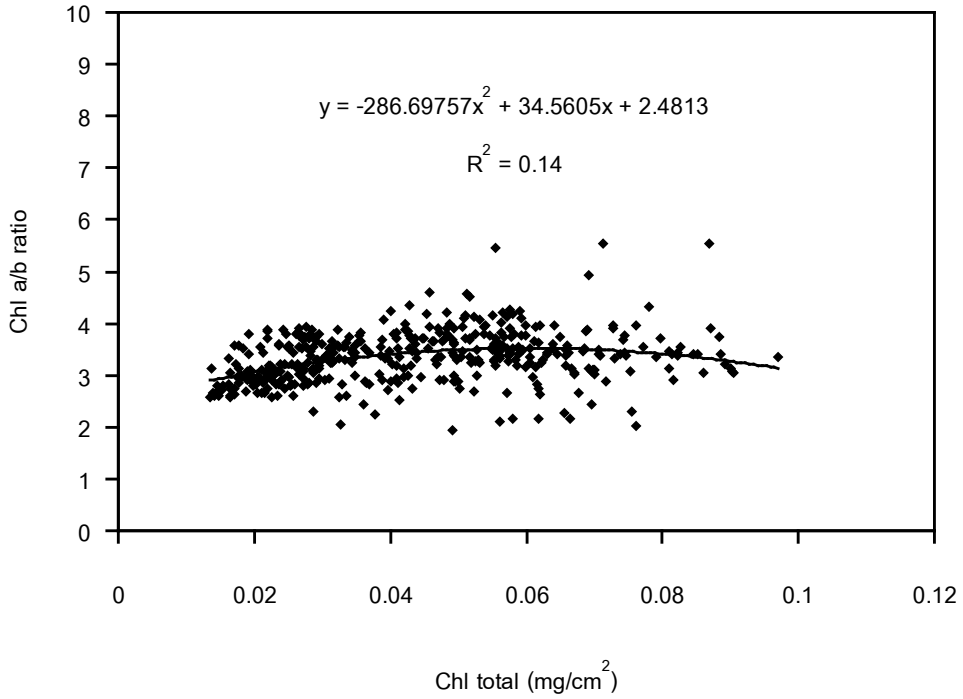

Figure 3 Relationship between chlorophyll a/b ratio and extracted chlorophyll concentration of 'Thong Dee' pummelo leaves.

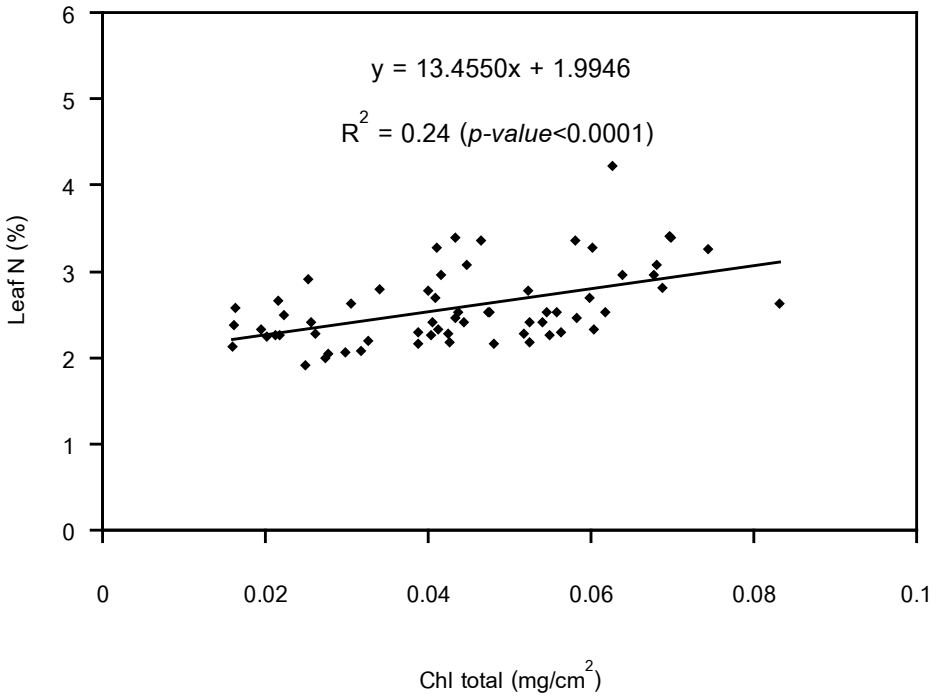

Figure 4 Relationship between total chlorophyll concentration and nitrogen concentration of 'Thong Dee' pummelo leaves.

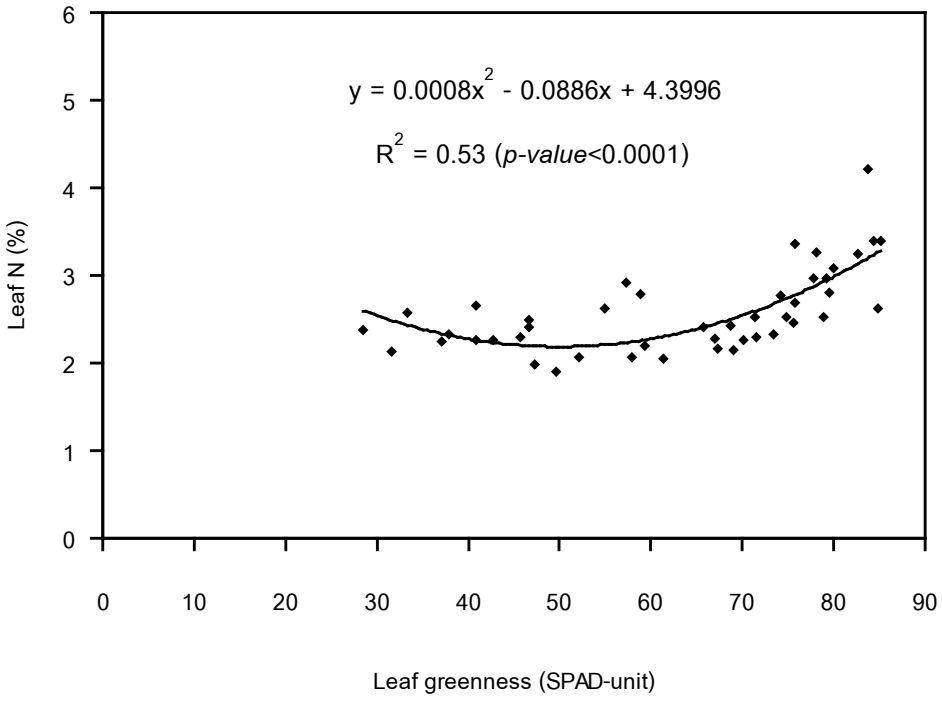

Figure 5 Relationship between the degree of leaf greenness and nitrogen concentration of 'Thong Dee' pummelo leaves.