การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ที่สกัดด้วยตัวทำละลายหลายชนิดด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ในใบของบุกเนื้อทราย

Spectrophotometric Determination of Chlorophyll and Carotenoid Contents of *Amorphophallus muelleri* Blume Leaves using Different Solvents

ณัฐธิดา อินปิก[1] และบุบผา คงสมัย[1*]

Nuttida In-pik[1] and Buppa Kongsamai[1*]

Received: November 10, 2021

Revised: December 13, 2021

Accepted: December 14, 2021

Abstract: The objectives of this study were to compare the chlorophyll and carotenoid content extracted from Amorphophallus *muelleri* leaf tissues by different solvents and to evaluate the relationship between the extracted chlorophyll content and greenness values measured by SPAD meter. In the present study, chlorophyll and carotenoid were extracted from mature leaves by using dimethyl sulfoxide (DMSO), 95% ethanol, 80% acetone, and 90% acetone. The experiment was carried out with a completely randomized design with 30 replications (plants). It showed that the highest chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll content were observed when DMSO and 95% ethanol were used as extracted solvent while the highest carotenoid concentration was obtained with 80% and 90% acetone solvent. SPAD reading and chlorophyll content were positively related. The linear regression equations obtained were y=0.0682x-1.0577 (R^2=0.70), y=0.0459x-0.6321 (R^2=0.67) and y=0.0221x-0.4285 (R^2=0.73) to assess total chlorophyll, chlorophyll a, and chlorophyll b content, respectively. It indicated that measurement by chlorophyll meter is a rapid technique for the evaluation of total chlorophyll in *A. muelleri* leaves.

Keywords: *Amorphophallus muelleri*, pigment, leaf greeness value, chlorophyll meter

บทคัดย่อ: การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ที่สกัดจากเนื้อเยื่อใบบุกเนื้อทรายด้วยสารสกัดชนิดต่างๆ และเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคลอโรฟิลล์ที่ประเมินได้และค่าความเขียวของใบที่วัดด้วยเครื่องคลอโรฟิลล์มิเตอร์ ในการศึกษานี้ทำการสกัดคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์จากใบที่เจริญเต็มที่แล้วของบุกเนื้อทรายด้วยสารละลายไดเมทิลซัลฟอไซด์ (DMSO) เอทานอล 95% อะซีโตน 80% และอะซีโตน 90% โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำ 30 ซ้ำ (ต้น) พบว่า ตัวทำละลายที่ให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และคลอโรฟิลล์รวมสูงสุดคือ DMSO และเอทานอล 95% ส่วนปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุดเมื่อสกัดด้วยอะซีโตน 80% และอะซีโตน 90% ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเขียวใบที่วัดด้วยคลอโรฟิลล์มิเตอร์มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณคลอโรฟิลล์ โดยมีสมการถดถอยเชิงเส้นตรงเป็น y=0.0682x-1.0577 (R^2=0.70), y=0.0459x-0.6321 (R^2=0.67) และ y=0.0221x-0.4285 (R^2=0.73) สำหรับประเมินปริมาณคลอโรฟิลล์รวม

[1] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

[1] Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140.

*Corresponding author: agrbuk@ku.ac.th

คลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บี ตามลำดับ ดังนั้นค่าความเขียวใบจึงสามารถใช้ประเมินปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบบุกเนื้อทรายแบบไม่ทำลายตัวอย่างเพื่อบ่งชี้ความสมบูรณ์ของต้นพืชได้

คำสำคัญ: บุกเนื้อทราย รงควัตถุ ค่าความเขียวของใบ คลอโรฟิลล์มิเตอร์

คำนำ

คลอโรฟิลล์ซึ่งเป็นรงควัตถุหลักที่พบมากในใบพืชสีเขียวมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์แสง ประกอบด้วย คลอโรฟิลเอและคลอโรฟิลบีทำหน้าที่ดูดซับและถ่ายทอดพลังงานแสงไปยังคลอโรพลาสต์ซึ่งเป็นแหล่งของการเกิดปฏิกริยาสังเคราะห์แสง ส่วนแคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่มีหน้าที่ดูดกลืนแสงเพื่อใช้ในการสังเคราะห์แสงและป้องกันคลอโรฟิลล์ไม่ให้ถูกทำลายจากแสงที่มีความเข้มสูง (DellaPenna, 1999) ดังนั้นปริมาณรงควัตถุจึงมีความสัมพันธ์โดยตรงต่อศักยภาพในการสังเคราะห์แสง ซึ่งปัจจัยทางสภาพแวดล้อม เช่น สภาพขาดน้ำ ดินเค็ม การขาดธาตุไนโตรเจน หรือการเข้าทำลายของศัตรูพืชส่งผลต่อการลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์รวมและแคโรทีนอยด์ในใบรวมทั้งการให้ผลผลิตของพืชหลายชนิด (Dekov *et al*., 2000; Shah *et al*., 2017) ดังนั้นการวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุในใบพืชจึงเป็นตัวชี้วัดสำคัญที่แสดงถึงผลกระทบของสภาพแวดล้อมที่มีต่อการเจริญเติบโตของพืชและความสมบูรณ์ของพืชได้ (Hendry and Price, 1993) โดยทั่วไปการสกัดคลอโรฟิลล์จากเนื้อเยื่อใบพืชจะใช้สารสกัดชนิดต่างๆ เช่น อะซีโตน เอทานอล DMF (N,N-dimethylformamide) และ DMSO (dimethyl sulfoxide) ได้มีรายงานไว้ในสาหร่ายและพืชหลายชนิด เช่น ถั่วเขียวผิวดำ ปาล์มน้ำมัน ส้มโอ ผักโขม สน และส้ม เป็นต้น (สิริมาศ และคณะ, 2555; Barnes *et al*., 1992; Makeen *et al*., 2007; Minocha *et al*., 2009) Hiscox and Israelstam (1979) เสนอวิธีสกัดคลอโรฟิลล์จากใบพืชอย่างง่าย รวดเร็ว และใช้ได้กับตัวอย่างพืชที่มีปริมาณคลอโรฟิลล์น้อยโดยไม่บดตัวอย่างด้วยสารละลาย DMSO ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ซึ่ง Makeen *et al*. (2007) และ Minocha *et al*. (2009) ก็ได้รายงานการใช้ DMSO อะซีโตน และเอทานอล 95% เป็นสารสกัดซึ่งสามารถสกัดคลอโรฟิลล์จากเนื้อเยื่อพืชหลายชนิดโดยไม่ต้องบดตัวอย่างเช่นกัน แล้วประเมินความเข้มข้นคลอโรฟิลล์จากสารสกัดที่ได้โดยวัดค่าการดูดแสงของสารละลายสกัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ตามสูตรที่รายงานไว้โดย Arnon (1949) Lichtenthaler (1987) และ Wellburn (1994) เป็นต้น

ปัจจุบันการประเมินปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบพืชวัดได้จากความเขียวของใบที่วัดโดยใช้คลอโรฟิลล์มิเตอร์ (SPAD-501, Minolta Camera Co. Ltd.) โดยไม่ทำลายตัวอย่างพืช ซึ่งค่าความเขียวของใบที่วัดได้มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (R^2 เท่ากับ 0.83-0.97) กับปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบพืชหลายชนิด คลอโรฟิลล์มิเตอร์จึงนำมาประยุกต์ในการประเมินปริมาณไนโตรเจนในพืชเพื่อจัดการปุ๋ยตามความต้องการของพืชในแปลงปลูกได้ (Balouchi, 2010; Cuin *et al*., 2010; Akhter *et al*., 2016) อย่างไรก็ตาม Markwell *et al.* (1995) พบว่า ค่าความเขียวของใบถั่วเหลืองและข้าวโพดมีความสัมพันธ์แบบไม่เป็นเส้นตรงกับปริมาณคลอโรฟิลล์ ซึ่งความสัมพันธ์ดังกล่าวขึ้นอยู่กับชนิดและพันธุ์พืช ความหนาใบ และธาตุอาหาร เป็นต้น (Giunta *et al*. 2002; Munns and James, 2003)

บุกเนื้อทราย (*Amorphophallus muelleri*) เป็นพืชหัวที่มีปริมาณของกลูโคแมนแนนสูงมาก พบทางภาคเหนือและภาคตะวันตกของประเทศ ได้แก่ เชียงใหม่ ลำปาง เชียงราย ตาก แม่ฮ่องสอน และกาญจนบุรี ปัจจุบันเริ่มได้รับความสนใจปลูกเชิงการค้ากันมากขึ้น โดยทั่วไปการให้ผลผลิตบุกในสภาพแปลงเกษตรกรค่อนข้างต่ำ เนื่องจากขาดการดูแลจัดการแปลงปลูกโดยเฉพาะปุ๋ยและน้ำ ซึ่งมีรายงานว่าบุกเป็นพืชที่ตอบสนองต่อการใส่ปุ๋ยเคมีและปุ๋ยอินทรีย์ได้ดี โดยผลผลิตสูงขึ้นเมื่อให้ปุ๋ยเคมีในอัตราที่เหมาะสม (Santosa *et al*., 2011) ดังนั้นการวัดค่าความเขียวใบ และปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบจึงอาจจะ

เป็นดัชนีชี้วัดสภาพความสมบูรณ์ของต้นพืชได้ทำนองเดียวกับการศึกษาในพืชชนิดอื่น การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารละลาย 3 ชนิดต่อการสกัดคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์จากใบบุกเนื้อทราย และทราบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคลอโรฟิลล์และความเขียวของใบเพื่อพัฒนาเป็นโมเดลสำหรับนำไปใช้ประเมินปริมาณคลอโรฟิลล์จากค่าที่วัดด้วยเครื่องวัดความเขียวของใบซึ่งสะดวกและไม่ยุ่งยากได้ และนำไปปรับใช้ร่วมกับการประเมินความสมบูรณ์ของต้นบุกเนื้อทรายในสภาพแปลงต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การวัดค่าความเขียวของใบและเก็บตัวอย่างพืช

เลือกใบย่อยที่อยู่ปลายสุดของแขนงใบบุกเนื้อทรายเมื่อถึงระยะที่แผ่นใบมีการคลี่กางเต็มที่เพื่อวัดความเขียวของใบด้วยคลอโรฟิลล์มิเตอร์บริเวณแผ่นใบทั้ง 2 ซีกของใบ ซีกละ 2 ตำแหน่งแล้วหาค่าเฉลี่ยความเขียวใบต่อใบ จากนั้นเก็บใบดังกล่าวมาสกัดคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ในห้องปฏิบัติการจำนวน 30 ตัวอย่างจากต้นบุกเนื้อทราย ที่ปลูกโดยใช้หัวใต้ดินหรือหัวบนใบในเข่งพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 นิ้ว บรรจุดินผสมซึ่งประกอบด้วยดิน ปุ๋ยหมัก และถ่านแกลบ สัดส่วน 1:1:1 ทำการพรางแสงด้วยซาแลนสีดำที่พรางแสง 50% ให้น้ำด้วยสปริงเกลอร์ ทุก 3-4 วันในช่วงเดือนแรกหลังปลูกประมาณ 15-20 นาที ต่อครั้ง หลังจากนั้นให้น้ำทุกสัปดาห์ ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 อัตรา 5 กรัมต่อต้น 1 ครั้งเมื่อถึงระยะที่แผ่นใบมีการคลี่กางเต็มที่ ดำเนินการทดลองที่แปลงเกษตรกร ตำบลทุ่งขวาง อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ระหว่างเดือนมีนาคมถึงพฤษภาคม พ.ศ. 2563-2564

2. การสกัดคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์จากตัวอย่างใบด้วยสารละลาย

สกัดรงควัตถุด้วยสารละลาย 4 ชนิดคือ อะซีโตน 80% อะซีโตน 90% เอทานอล 95% และ DMSO โดยดัดแปลงจากวิธีของ Minocha *et al.* (2009) ดังนี้ เจาะแผ่นใบตัวอย่างบริเวณตำแหน่งที่วัดค่าความเขียวใบโดยใช้ที่เจาะกระดาษเป็นชิ้นใบวงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร จำนวน 4 ชิ้นต่อหลอด ชั่งน้ำหนักชิ้นใบแล้วใส่ในหลอด microfuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ตัวอย่างละ 2 หลอด เติมสารละลายสกัดคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ที่ต้องการปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิทและคลุมปิดด้วยแผ่นอลูมินัมฟอยด์ตัวอย่างใบที่สกัดด้วยอะซีโตน 80% อะซีโตน 90% และเอทานอล 95% นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 8 ^{o}C จนกระทั่งชิ้นใบซีดขาว จึงดูดสารสกัดที่ได้ใส่ 96 well-ELISA plate ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ทำ 2 wells ต่อหลอด และใช้สารละลายที่สกัดเป็น blank นำไปวัดค่าการดูดแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง Thermo Model Multiskan Go (Sysinfo system co., LTD) ที่ความยาวคลื่น 470, 645 และ 663 นาโนเมตร จากนั้นนำไปคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ (mg.g^{-1}) ตามสมการของ Arnon (1949) ดังนี้

คลอโรฟิลล์เอ = [(12.7 A663 -2.59 A645) x V]/(1000 x wt)
คลอโรฟิลล์บี = [(22.9 A645) - (4.67 A663)) x V]/(1000 x wt)
คลอโรฟิลล์รวม= [(20.31 A645 + 8.05 A663) x V]/ (1000 x wt)
แคโรทีนอยด์ = [(1000 A470 - 1.82 Chl.a - 85.02 Chl.b)/198) x V]/ (1000 x wt)
เมื่อ V= ปริมาตรสารละลายในหลอดทดลอง (ในที่นี้ใช้ 1.5 มิลลิลิตร) และ wt = น้ำหนักใบที่ใช้สกัด (กรัม)

ส่วนตัวอย่างใบที่สกัดด้วย DMSO หลังเติมสารละลาย 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำหลอดไปแช่ใน water bath ทันทีที่อุณหภูมิ 70 ^{o}C นาน 30 นาที นำออกจาก water bath ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วดูดสารสกัดที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงและคำนวณตามวิธีการข้างต้น เพื่อสร้างสมการถดถอยเส้นตรงสำหรับคาดคะเนปริมาณคลอโรฟิลล์ที่วิเคราะห์ได้จากค่าที่อ่านได้ด้วยคลอโรฟิลล์มิเตอร์ ได้เก็บตัวอย่างใบเพื่อวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุอีก 26 ตัวอย่างในปี พ.ศ. 2564

3. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนในลักษณะปริมาณคลอโรฟิล แคโรทีนอยด์ และความเขียวของใบ ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) จำนวน 30 ซ้ำ เมื่อตรวจพบนัยสำคัญทางสถิติในลักษณะที่ศึกษา จะทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างชนิดของสารละลายที่ใช้สกัดโดยใช้วิธี Tukey's test (Tukey's Multiple Comparison test) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคลอโรฟิลล์ที่สกัดด้วยสารละลายที่มีประสิทธิภาพสกัดดีที่สุดและค่าความเขียวของใบโดยสร้างสมการถดถอยเชิงเส้นตรง วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมวิเคราะห์สถิติสำเร็จรูป STAR version 2.0.1 (2014)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเปรียบเทียบปริมาณรงควัตถุที่สกัดได้จากใบบุกเนื้อทราย

จากการสกัดรงควัตถุด้วยสารละลายชนิดต่างๆ พบว่า ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ มีค่าระหว่าง 0.83-1.16 มิลลิกรัมต่อกรัม คลอโรฟิลล์บี 0.35-0.49 มิลลิกรัมต่อกรัม และแคโรทีนอยด์ 0.42 -0.50 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนในลักษณะปริมาณรงควัตถุที่สกัดด้วยสารละลาย 4 ชนิด พบว่า สารสกัดที่ใช้นั้นมีผลต่อปริมาณรงควัตถุที่ประเมินได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) (Table 1) โดยที่ตัวอย่างใบซึ่งสกัดด้วย DMSO และ ethanol 95% มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์รวมไม่แตกต่างกัน แต่มีปริมาณรงควัตถุดังกล่าวสูงกว่าการสกัดด้วย acetone 80% และ 90% เท่ากับ 25-28 เปอร์เซ็นต์ ในทางตรงกันข้ามการสกัดด้วย acetone 80% นั้นให้ปริมาณคลอโรฟิลล์บีสูงที่สุด (0.49 มิลลิกรัมต่อกรัม) รองลงมาคือ ethanol 95%, acetone 90% และ DMSO ตามลำดับ สัดส่วนของคลอโรฟิลล์เอต่อคลอโรฟิลล์บี อยู่ระหว่าง 1.80-3.33 โดยที่การสกัดด้วย Ethanol 95% และ DMSO มีสัดส่วนคลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บีสูง (2.5-3.33:1) ส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์รวมสูงตามไปด้วยและมีประสิทธิภาพดีกว่าการสกัดด้วย acetone (Table 1) ทำนองเดียวกับ Kumari *et al*. (2018) ที่พบว่า ปริมาณคลอโรฟิลล์เอจะสูงกว่าคลอโรฟิลล์บี 2-3 เท่าในถั่วเลนทิวซึ่งสกัดด้วย DMSO และ acetone 80% โดยการสกัดด้วย DMSO มีแนวโน้มให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ที่สูงกว่าประมาณ 18 เปอร์เซ็นต์

สำหรับปริมาณแคโรทีนอยด์ก็พบว่า ให้ผลทำนองเดียวกับปริมาณคลอโรฟิลล์เอ กล่าวคือ การสกัด DMSO และ ethanol 95% ให้ผลดีกว่าการใช้ acetone เป็นสารสกัด โดยเฉพาะ ethanol 95% ใช้เวลาในการสกัดสั้นกว่า คือ 3 วันขณะที่ acetone ใช้เวลานานถึง 14 วันจนกว่าใบจะมีสีซีดขาว ชิ้นใบบางส่วนยังมีสีเขียวปะปนเล็กน้อย ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ได้ปริมาณรงควัตถุน้อยกว่าสารสกัดชนิดอื่น

การใช้ ethanol 95% เป็นสารสกัดนั้นมีข้อดีคือ การใช้งานง่าย ปลอดภัย และราคาไม่แพง ขณะที่ DMSO แม้ว่าสามารถใช้สกัดคลอโรฟิลล์ได้ดี และสารสกัดมีความเสถียร แต่มีความเป็นพิษต่อคน และเป็นสารที่มีกลิ่นแรง มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิสูง (Porra, 2002; Tait and Hik, 2003; Kumari *et al*., 2018) จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าควรเลือกใช้ ethanol 95% เป็นสารสกัดคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์โดยไม่จำเป็นต้องบด ปั่น หรือกรองสารสกัดของตัวอย่างใบ

นอกจากนี้ยังพบว่า ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี คลอโรฟิลล์รวม และแคโรทีนอยด์ที่สกัดจากใบย่อยตำแหน่งปลายและโคนใบนั้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ทำนองเดียวกับค่าความเขียวของใบ (SPAD value) ที่วัดด้วยคลอโรฟิลล์มิเตอร์ของใบย่อย 2 ตำแหน่งก็ให้ผลไม่แตกต่างกัน แสดงว่า สามารถสุ่มเก็บใบย่อยตำแหน่งใดๆ บนใบมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ได้โดยจะให้ผลใกล้เคียงกัน ซึ่งในการทดลองนี้มีค่าความเขียวของใบบุกเนื้อทรายระหว่าง 32.80-57.40

จากการศึกษาในพืชไม้น้ำซึ่งส่วนใหญ่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ 80-90 เปอร์เซ็นต์ พบว่า การสกัดด้วย acetone 90% มีประสิทธิภาพในการสกัดคลอโรฟิลล์ดีกว่า ethanol 95% และ acetone 80% แต่จากการทดลองนี้การสกัดคลอโรฟิลล์จาก

ใบบุกเนื้อทรายด้วย DMSO หรือ ethanol 95% ให้ผลดีกว่า acetone และหากพิจารณาด้านความปลอดภัยของผู้ทดลองจึงมีข้อเสนอแนะให้เลือกใช้ ethanol 95% เป็นสารละลายในการสกัด เนื่องจากหาได้ง่าย และราคาไม่สูงมาก การเตรียมสารสกัดทำได้สะดวก และรวดเร็วโดยเฉพาะการใช้วิธีสกัดตามวิธีของ Arnon (1949)

Table 1 Means of chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll and carotenoid ($mg.g^{-1}$) extracted with four solvents from *Amorphophallus muelleri* Blume leaves.

Solvents	Chl a[1/]	Chl b	Tot chl	Carotenoid	Chl a/Chl b
Acetone 80%	0.83±0.02b	0.49±0.02a	1.32±0.03b	0.42±0.008b	1.80±0.05d
Acetone 90%	0.88±0.02b	0.38±0.01c	1.25±0.03b	0.40±0.009b	2.35±0.03c
Ethanol 95%	1.11±0.02a	0.44±0.01b	1.55±0.03a	0.50±0.010a	2.51±0.01b
DMSO	1.16±0.03a	0.35±0.01c	1.51± 0.04a	0.48±0.011a	3.33±0.02a
Mean	0.99±0.03	0.42±0.02	1.41±0.05	0.44±0.0135	2.50±0.04
F-test[2/]	**	**	**	**	**
CV(%)	25.58	29.41	24.91	23.51	12.75

[1/]Chl a = chlorophyll a, Chl b = chlorophyll b and Tot chl = total chlorophyll.
Values are means±SE and are significantly different (p<0.05) when followed by different letters in the same column, according to Tukey's test.
[2/] ** significant at the 0.01 probability level.

2. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคลอโรฟิลล์รวมที่วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตมิเตอร์กับค่าความเขียวใบที่อ่านได้จากคลอโรฟิลล์มิเตอร์

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ethanol 95% สกัดรงควัตถุในใบบุกเนื้อทรายได้มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างจาก DMSO แต่ ethanol 95% มีความปลอดภัยและไม่เป็นพิษต่อผู้ใช้ ดังนั้นจึงเหมาะสำหรับเลือกใช้เป็นสารสกัดคลอโรฟิลล์จากใบของบุกเนื้อทรายและศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคลอโรฟิลล์กับค่าความเขียวใบ ซึ่งพบว่า ปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบพืชแปรผันเชิงบวกตามค่าความเขียวใบ กล่าวคือ ปริมาณคลอโรฟิลล์มีค่าเพิ่มขึ้นตามค่าความเขียวใบที่เพิ่มขึ้น โดยที่สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี และคลอโรฟิลล์รวมกับค่าความเขียวใบ มีค่าเท่ากับ 0.82 (p<0.01), 0.85 (p<0.01) และ 0.84 (p<0.01) ตามลำดับ (Figure 1) ปัจจัยที่ส่งผลต่อความแม่นยำของการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ได้แก่ สภาพความสมบูรณ์ของใบพืชและเทคนิคการวัดด้วยคลอโรฟิลล์มิเตอร์ (Sim *et al*., 2015; Zulkamaini *et al*., 2019) โดยทั่วไปแผ่นใบบุกเนื้อทรายมีแผ่นใบหนาและมีน้ำเป็นองค์ประกอบสูง และค่าความเขียวใบที่วัดได้แปรผันตามความสมบูรณ์ของต้น ซึ่งมีข้อสังเกตว่า ต้นซึ่งขยายมาจากหัวใต้ดินมีแผ่นใบใหญ่หนา และมีแนวโน้มให้ค่าความเขียวใบสูงกว่าต้นที่ขยายจากหัวบนใบ โดยมีค่าความเขียวใบเท่ากับ 45.00±4.97 และ 34.66±5.31 ตามลำดับ (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

เมื่อนำค่าปริมาณคลอโรฟิลล์รวม คลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บีมาหาความสัมพันธ์กับค่าความเขียวใบที่อ่านได้จากคลอโรฟิลล์มิเตอร์ พบว่า สมการถดถอยเชิงเส้นตรงที่ได้มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) ด้วยค่า R^2 ระหว่าง 0.67-0.73 (Figure 1) ซึ่งค่า R^2 ดังกล่าวใกล้เคียงกับสมการทำนายความสัมพันธ์ระหว่างคลอโรฟิลล์รวม คลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บีในใบมะเขือเทศระยะก่อนออกดอกที่มีค่าระหว่าง 0.56-0.73 แสดงว่า สมการดังกล่าวมีความเหมาะสม

สำหรับใช้ประเมินปริมาณคลอโรฟิลล์ได้ (Jiang *et al*., 2017) ซึ่งอาจนำไปใช้ประเมินความสมบูรณ์พืชและการจัดการปุ๋ยไนโตรเจนในแปลงได้ โดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเขียวใบร่วมกับอัตราการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน และความอุดมสมบูรณ์ของดินสำหรับการผลิตบุกเนื้อทรายต่อไป ทำนองเดียวกับการศึกษาในพืชอื่น ๆ เช่น พืชอาหารสัตว์ (พรเทพและระวี, 2560) มันฝรั่ง (Fernandes *et al*., 2021) และข้าวโพด (Udding *et al*., 2007) เป็นต้น นอกจากนี้ Yang *et al*. (2014) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเขียวใบกับค่าดัชนีปริมาณไนโตรเจนจากใบที่ 4 จากยอดของข้าวในระยะออกรวงที่แสดงอาการขาดธาตุไนโตรเจนและต้นปกตินั้น มีค่าความเขียวใบประมาณ 35 และ 43 ตามลำดับ

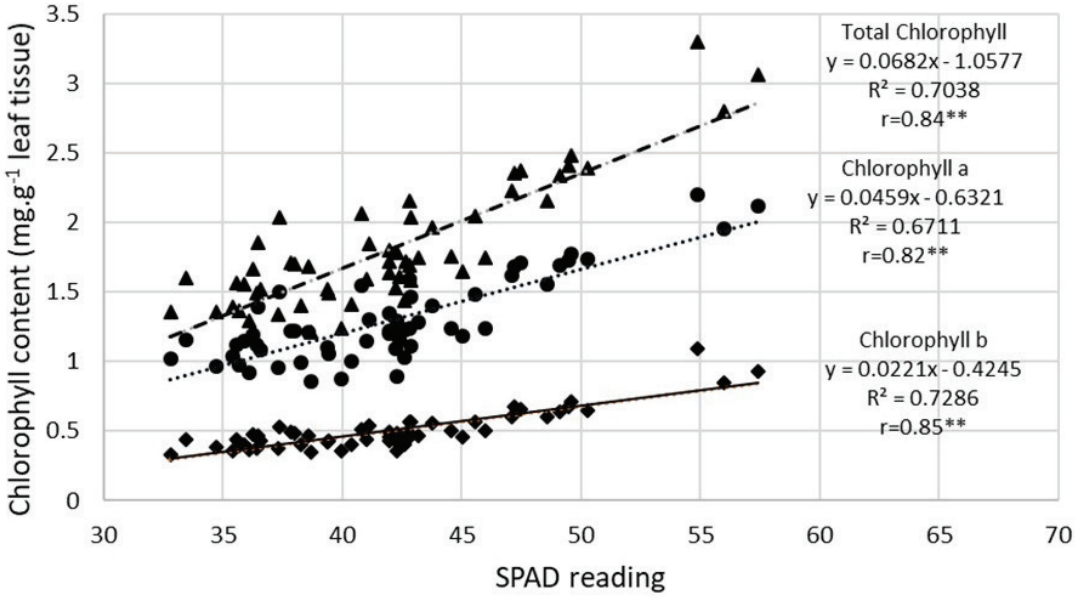

Figure 1 Relationship between chlorophyll content extracted with ethanol 95% and SPAD reading measured from 56 samples of *Amorphophallus muelleri* Blume leaves. Y = total chlorophyll content; X = SPAD reading,

สรุป

ปริมาณคลอโรฟิลล์จากเนื้อเยื่อใบของบุกเนื้อทรายขึ้นอยู่กับสารที่ใช้สกัด การใช้ DMSO หรือ ethanol 95% สามารถสกัดคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และคลอโรฟิลล์รวม ได้ดีกว่าการใช้ acetone 80% และ acetone 90% ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเขียวใบ (SPAD) ที่วัดด้วยคลอโรฟิลล์มิเตอร์มีความสัมพันธ์สูงกับคลอโรฟิลล์ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย ethanol 95% และสามารถใช้ประเมินปริมาณคลอโรฟิลล์ของใบบุกเนื้อทรายได้ดี

เอกสารอ้างอิง

พรเทพ ธีระวัฒนพงศ์ และระวี เจียรวิภา. 2560. การประเมินคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ในพืชอาหารสัตว์โดยใช้ SPAD-502Plus และ GreenseekerTM, หน้า 104-110. *ใน*: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 55 สาขาพืช, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สิริมาส วงศ์สุบรรณ กฤษณา กฤษณพุกต์ และลพ ภวภูตานนท์. 2555. การใช้คลอโรฟิลล์มิเตอร์ประเมินระดับคลอโรฟิลล์และไนโตรเจนในใบส้มโอ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 1(3):40-50.

Akhter. M. M., A. Houssain., J. Timsina., J.A.T. Silva and M.S. Islam. 2016. Chlorophyll meter – a decision-making tool for nitrogen application in wheat under

light soils. International Journal of Plant Production 10(3):289-302.

Arnon. D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgris*. Plant Physiology 24: 1-15.

Balouchi. H.R. 2010. Screening wheat parents of mapping population for heat and drought tolerance detection of wheat genetic variation. International Scholarly and Scientific Research and Innovation 4(6): 61- 71.

Barnes, J.D., L. Blaguer, E. Manrique, S. Elvira and A.W. Davison. 1992. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophyll a and b in lichens and higher plants. Environmental and Experimental Botany 32: 85-100.

Cuin. T. A., D. Parsons and S. Shabala. 2010. Wheat cultivars can be screened for NaCl salinity tolerance by measuring leaf chlorophyll content and shoot sap potassium. Functional Plant Biology 37(7): 656-664. doi: org/10.1071/FP09229.

Dekov. I., T. Tsonev. and I. Yordanov. 2000. Effects of water stress and high-temperature stress on the structure and activity of photosynthetic apparatus of *Zea mays* and *Helianthus annuus.* Photosynthetica 38(3): 361-366, 2000. doi: 10.1023/a:1010961218145.

DellaPenna, D. 1999. Carotenoid synthesis and function in plants: insights from mutant studies in *Arabidopsis thaliana*, pp.21-37. *In*: Frank, H.A., A.J. Young, G. Britton and R.J. Cogdell (eds.). The Photochemistry of Carotenoids. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.

Fernandes, F.M., R.P. Soratto, A.M. Fernandes and E.F.C. Souza. 2021. Chlorophyll meter-based leaf nitrogen status to manage nitrogen in tropical potato production. Agronomy Journal 113(2): 1733-1746.

Francisco. J. C. G., R. A. Marenco. and G. Vieira. 2001. Concentration of photosymthetic pigments and chlorophyll fluorescence of mahogany and tonka bean under two light evaroments. Institute for Research in the Amazon., C.P.478, 69011-970.

Giunta. F., R. Motzo and M. Deidda. 2002. SPAD readings and associated leaf traits in durum wheat, barley and triticale cultivars. Euphytica 125: 197–205.

Hendry. G.A.F. and A.H. Price. 1993. Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. pp. 148–152. *In* G.A.F. Hendry and J.P. Grime (eds.). Methods in Comparative Plant Ecology. Chapman & Hall, London.

Hiscox, J.D. and G.F. Israelstam. 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. Canadian Journal of Botany 57: 1332-1334.

Jiang, c., M. Johkan., M. Hohjo., S. Tsukagoshi and T. Maruo. 2017. A correlation analysis on chlorophyll content and SPAD value in tomato leaves. HortResearch 71: 37-42.

Kumari, R. S. Ashraf, G.K. Bagri, S.K. Khatik, D.K. Bagri and D.L. Bagdi. 2018. Extraction and estimation of chlorophyll content of seed treated lentil crop using DMSO and acetone. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 7: 249-250.

Lichtenthaler. H.K. 1987. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. Methods in Enzymology. 148, 350-382.

Makeen, K., G. Suresh Babu, G.R. Lavanya and G. Abraham. 2007. Studies of chlorophyll content by different methods in black gram (*Vigna mungo* L.). International Journal of Agricultural Research 2: 651-654.

Markwell, J., J.C. Osterman and J.L. Mitchell. 1995. Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. Photosynthesis Research 46:467-472.

Minocha, R. G. Martinez, B. Lyons and S. Long. 2009. Development of a standardized methodology for quantifying total chlorophyll and carotenoids from foliage of hardwood and conifer tree species. Canadian Journal of Forest Research 39: 849-861.

Munns. R. and R.A.Jame. 2003. Screening methods for salinity tolerance: a case study with tetraploid wheat. Plant and Soil 253: 201–18.

Porra, R.J. 2002. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. Photosynthesis Research 73: 149-156.

Santosa. E., I. Setiasih, Y. Mine and N. Sugiyama. 2011. Nitrogen and potassium applications on the growth of *Amorphophallus muelleri* Blume. Journal of Agronomy of Indonesia 39(2):124-130.

Shah, S.H., R. Houborg and M.F. McCabe. 2017. Response of chlorophyll, carotenoid and SPAD-502 measurement to salinity and nutrient stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). Agronomy 61.doi: 10.3390/agronomy7030061.

Sim, C. C., A.R. Zaharah, M.S. Tan and K.J. Goh. 2015. Rapid determination of leaf chlorophyll concentration, photosynthesis activity and NK concentration of *Elaies guineensis* via correlated SPAD-502 chlorophyll index. Asian Journal of Agricultural Research 9: 132-138.

Tait, M.A. and D.S. Hik. 2003. Is dimethylsulfoxide a reliable solvent for extracting chlorophyll under field conditions. Photosynthesis Research 78: 87-91.

Uddling, J., J. Gelang-Affredsson and K. Piikki. 2007. Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. Photosynthesis Research 91: 37-46.

Wellburn. A. R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. Journal of Plant Physiology 144(3): 307-313. doi: org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2.

Yang. H., J. Yang., Y Lv and J. He. 2014. Spad values and nitrogen nutrition index for the evaluation of rice nitrogen. Plant Production Science 17(1): 81-92. doi:10.1626/pps.17.81.

Zulkarnaini, Z.M., S.Z. Sakimin, M.T.M. Mohamed and H.Z.E. Jaafar. 2019. Relationship between chlorophyll content and soil plant analytical development values in two cultivars of fig (*Ficus carica* L.) as brassinolide effect at an open field. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science Science 250, doi: 10.1088/1755-1315/250/1/012025.