บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 แหล่งน้ำที่ทำการศึกษาสาหร่ายและคุณภาพน้ำ

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่าง ในอ่างเก็บน้ำเขื่อนสิรินธร ซึ่งเขื่อนสิรินธร ตั้งอยู่ที่ อำเภอสิรินธร จังหวัดอุบลราชธานี กำหนดจุดเก็บตัวอย่าง 10 จุด ดังนี้

- จุดที่ 1 - 6 อยู่บริเวณภายในตัวเขื่อน เริ่มจากหน้าสันเขื่อน ไปทุกๆ 1 กิโลเมตร
- จุดที่ 7 จุดที่ได้รับผลกระทบจากกิจกรรมของชุมชน บริเวณพัทยาน้อย
- จุดที่ 8 จุดที่ได้รับผลกระทบจากกิจกรรมของชุมชน บริเวณหมู่บ้านคำก้อม ตำบลฝางคำ อำเภอสิรินธร จังหวัดอุบลราชธานี
- จุดที่ 9 บริเวณประตูเขื่อนสิรินธร
- จุดที่ 10 บริเวณน้ำจากเขื่อนสิรินธรไหลมาบรรจบกับแม่น้ำมูลบริเวณเขื่อนปากมูล

3.2 อุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือวิจัยสาหร่ายและคุณภาพน้ำ

3.2.1 อุปกรณ์ในการศึกษาคุณภาพน้ำ สาหร่าย และแพลงก์ตอนพืช

1) อุปกรณ์เก็บน้ำเพื่อวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

- ขวดโพลีเอธิลีนขนาด 1 และ 2 ลิตร
- ขวดวัดค่าปริมาณออกซิเจนที่แบคทีเรียใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ และขวดวัดค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ

2) อุปกรณ์และสารเคมีในการเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อสำรวจชนิดและปริมาณของสาหร่าย และ แพลงก์ตอนพืช

- ตาข่ายแพลงก์ตอน ขนาดความถี่ 10 ไมครอน
- ขวดแก้วสีชาขนาด 100 มิลลิลิตร
- สารเคมี Lugol's solution ใช้ในการเก็บรักษาแพลงก์ตอนพืช
- ถังน้ำแข็งขนาดใหญ่
- บีกเกอร์ ขนาด 1,000 มิลลิลิตร

3) อุปกรณ์เก็บตัวอย่างน้ำเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย ได้แก่

- ขวดแก้วสีชาที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
- ปิเปต (Pipette) ขนาด 1 มิลลิลิตร

4) อุปกรณ์วิเคราะห์คุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมี

- เครื่องวัด pH (รุ่น YSI Model 63, USA)
- เครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า (Conductivity meter) (รุ่น YSI Model 63, USA)
- ไมโครปิเปตอัตโนมัติ (Automatic micropipette) (รุ่น Gilson P200, USA)
- เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
- สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ และปริมาณออกซิเจนที่แบคทีเรียใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ ได้แก่ แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$)

อัลคาไลน์ไอโอไดด์ เอไซด์ (Alkali iodode azide reagent หรือ AIA), กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) และโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.025N ($Na_2S_2O_3$) พร้อมทั้งชุดไทเทรต

- สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่าความเป็นด่างของน้ำ ได้แก่ ฟีนอล์ฟธาลีน (Phenolphthalein), เมทิลออเรนจ์ (Methyl Orange), กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.02 นอร์มอล (conc. H_2SO_4) และชุดไทเทรต ได้แก่ บิวเรต, ขวดรูปชมพู่, บีกเกอร์ และกระบอกตวง

- สารเคมีและอุปกรณ์วิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟต ได้แก่ ผงแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต, สารละลายฟีนอล์ฟธาลีน อินดิเคเตอร์, โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH), สารละลายโมลิบเดต (Molybdate solution), สารละลายสแตนนัสคลอไรด์ (Stannous chloride solution), น้ำกลั่น, เตาไฟฟ้า (Hot plate), ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร, เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) (รุ่น GENESYS UV 10, USA), คิวเวต (cuvette), ปิเปต และขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask)

- สารเคมีและอุปกรณ์วิเคราะห์ปริมาณไนเตรทได้แก่ เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์, คิวเวต, ปิเปต, ขวดรูปชมพู่, สารละลายบลูซีน-กรดซัลฟิวริก และน้ำกลั่น

5) อุปกรณ์วิเคราะห์คุณภาพน้ำทางชีวภาพบางประการ

- สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณ คลอโรฟิลล์ เอ ได้แก่ กระดาษกรอง GF/C (Glass fiber filter) และกระดาษกรอง Whatman No.1 กระดาษอะลูมิเนียมฟอยด์ โกร่งบดยาSpectrophotometer รุ่น GENESYS UV 10 สำหรับการวิเคราะห์คลอโรฟิลล์ เอ

- อุปกรณ์วิเคราะห์โคลิฟอร์มแบคทีเรีย ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl sulfate tryptose broth (LSTB) หลอดทดลอง (สูตรอาหารดังภาคผนวก ข)

6) อุปกรณ์ศึกษาชนิดและปริมาณสาหร่าย

- กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ (compound microscope) รุ่น OLYMPUS CH 30
- สไลด์และกระจกปิดสไลด์
- หนังสือในการจัดจำแนกชนิดของแพลงก์ตอนพืช
- Ocular micrometer และ stage micrometer
- Haemacytometer

อุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

1) ตัวอย่างน้ำ
2) หลองทดลองที่เป็นฝาเกลียว
3) ขวดแก้ว ขนาด 500 มิลลิลิตร
4) สูตรอาหารพื้นฐาน ได้แก่ สูตรโบลด์ สูตรปรับปรุงชู เบอร์ 10 และสูตร BG 11
5) น้ำทิ้งจากโรงอาหารมหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี
6) หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
7) เครื่องเสปกโตรโฟโตมิเตอร์ (รุ่น GENESYS UV 10, USA)
8) เครื่องวัด pH (รุ่น YSI Model 63, USA)
9) เครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า (รุ่น YSI Model 63, USA)

10) เครื่องเขย่า

การวางแผนการเก็บตัวอย่างความหลากหลายทางชีวภาพของสาหร่ายและคุณภาพน้ำ

วางแผนการเก็บตัวอย่างสาหร่าย และแพลงก์ตอนพืช ทำการเก็บตัวอย่างน้ำ 3 ฤดูกาล ทั้งหมด 10 จุดๆละ 3 ซ้ำ โดยกำหนดการเก็บตัวอย่างน้ำ ดังนี้

ฤดูหนาว ทำการเก็บตัวอย่างน้ำในวันที่ 20 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2554

ฤดูร้อน ทำการเก็บตัวอย่างน้ำในวันที่ 30 เมษายน พ.ศ. 2554

ฤดูฝน ทำการเก็บตัวอย่างน้ำในวันที่ 9 กรกฎาคม พ.ศ. 2554

การเก็บตัวอย่างความหลากหลายทางชีวภาพของสาหร่ายและคุณภาพน้ำ

- การเก็บตัวอย่างน้ำ ในตัวเขื่อนใช้เรือพายในการเก็บตัวอย่างน้ำ เก็บตัวอย่างจากจุดต่างๆ จุดละ 3 ลิตร ใส่ขวดพลาสติก โดยเก็บลึกประมาณ 30 เซนติเมตร นำตัวอย่างที่ได้ไปศึกษาคุณภาพน้ำทางด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพในห้องปฏิบัติการต่อไป

ศึกษาคุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมี ในอ่างเก็บน้ำเขื่อนสิรินธร ในจังหวัดอุบลราชธานี

- สังเกตสี กลิ่น ของน้ำแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง
- วัดอุณหภูมิของน้ำและอากาศโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์
- วัด pH ของแหล่งน้ำโดยใช้ pH meter รุ่น YSI Model 63
- วัดค่าการนำไฟฟ้าของน้ำโดยใช้ conductivity meter รุ่น YSI 63
- วิเคราะห์หาปริมาณ DO โดยใช้วิธี Azide modification (APHA, 1998)
- วัดค่าความลึกที่แสงส่องถึง (secchi depth) โดยใช้ Secchi disc

เก็บตัวอย่างมาทำการศึกษาคุณภาพน้ำทางกายภาพ เคมี และชีวภาพบางประการที่ห้องปฏิบัติการ

1. เก็บตัวอย่างน้ำใส่ขวดโพลีเอธิลีนมาทำการไทเทรตหาค่าความเป็นด่าง (alkalinity) โดยใช้วิธี Phenolpthalein methyl orange indicator (APHA, 1998)

2. หาปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) โดยวิธี Azide modification (APHA,1998)

3. วิเคราะห์หาปริมาณออกซิเจนที่แบคทีเรียใช้ย่อยสลายสารอินทรีย์ (BOD) ด้วยวิธีไทเทรตโดยวิธี Azide modification (APHA, 1998)

4. วิเคราะห์หาปริมาณไนเตรท-ไนไตรเจน และปริมาณฟอสเฟตทั้งหมดที่ละลายในน้ำ โดยใช้วิธี Spectrometic Method ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (รุ่น GENESYS UV 10)

การวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางชีวภาพบางประการ

1. หาปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ โดยวิธีของ Nusch (1980) และตรวจวัดโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer รุ่น GENESYS UV 10

2. เก็บตัวอย่างน้ำไปตรวจหา total และ fecal coliform bacteria โดยวิธี Standard multiple tube fermentation technique

3. เก็บสาหร่ายบริเวณแหล่งน้ำตามจุดที่กำหนด เพื่อนำไปวินิจฉัยแพลงก์ตอนพืชโดยการกรองน้ำ 50 ลิตร ผ่านตาข่ายแพลงก์ตอน ขนาดความถี่ 10 ไมครอน กรองน้ำให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ถ่ายลงใส่ขวดเก็บตัวอย่างสีชา และเก็บรักษาด้วยน้ำยา Lugol 1 มิลลิลิตร

การประเมินคุณภาพน้ำ (ภาคผนวก ข)

ประเมินคุณภาพน้ำโดยการให้ลำดับคะแนนตามหลักของ Lorraine and Vollenweider (1981) และ Wetzel (1983) ซึ่งประยุกต์โดยยุวดีและคณะ (2544) และมาตรฐานน้ำผิวดินของคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ พ.ศ.2537 และ AARL-PP score (ยุวดีและคณะ, 2544)

การศึกษาสาหร่าย

วินิจฉัยสาหร่ายโดยพยายามให้ถึงระดับชนิด โดยใช้หนังสือที่เกี่ยวข้อง เช่น หนังสือสาหร่ายน้ำจืดในภาคเหนือของประเทศไทย หนังสือในการจำแนกสาหร่ายขนาดใหญ่ หนังสือของ Desikachary (1959), Entwise (1989), Kumano (2002), Barber and Haworth (1981), Lange-Bertaot และ Kelly and Haworth, Pipp and Rott, Flora of New Zealand เล่มที่ I, II, III เป็นต้น ซึ่งทำการถ่ายรูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์ รุ่น OLYMPUS CH 30

การวิเคราะห์ข้อมูล

หาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพ เคมีและชีวภาพบางประการที่มีผลต่อการกระจายตัว และความหลากหลายทางชีวภาพของสาหร่าย เพื่อนำไปใช้เป็นดัชนีทางชีวภาพในการบ่งชี้คุณภาพน้ำต่อไป

วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายกลุ่มไดอะตอม สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และสาหร่ายสีเขียว

1) วิธีการเพาะเลี้ยงไดอะตอม

(1) เก็บตัวอย่างใส่กระปุกพลาสติก โดยเก็บตามก้อนหินที่มีลักษณะมีเมือกลื่นๆลักษณะสีน้ำตาล และการเก็บโดยกรองผ่านตาข่ายลากแพลงก์ตอน

(2) ตัวอย่างที่เก็บมาต้องนำมาแยกชนิดสาหร่ายให้บริสุทธิ์ โดยนำมาเลี้ยงใส่อาหารแข็งที่เตรียม ใส่ไว้ในเพลต มีอาหาร 3 สูตร คือ Bold's basal Media, Modified Chu No. 10 Media และ BG-11 Media โดยใช้วิธีการ Streak ลงบนอาหารแข็งเหมือนการแยกเชื้อแบคทีเรีย ปิดจานอาหารแล้วปิดทับด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำไปวางไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ใต้แสงไฟเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตเป็นเวลา 7 วัน

(3) นำเชื้อที่เลี้ยงไว้มาเลือกเอาเฉพาะโคโลนีของสาหร่าย ซึ่งลักษณะโคโลนีของสาหร่ายจะมีสีน้ำตาล เหลือง เขียว หรือเขียวแกมน้ำเงิน เพื่อความแน่ใจต้องนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

(4) จากนั้นเลือกโคโลนีที่เป็นโคโลนีของสาหร่ายที่เป็นชนิดเดียวกันนำมา Streak ลงบนอาหารแข็งอีกครั้งทำเหมือนครั้งแรก เพื่อให้แน่ใจว่าโคโลนีที่ได้เป็นเชื้อที่บริสุทธิ์ควร sub culture หลายๆครั้ง

(5) เมื่อได้เชื้อที่บริสุทธิ์แล้วนำเชื้อมาขยายใส่อาหารเหลวในสูตรอาหาร 3 สูตร คือ Bold's basal Media, Modified Chu No. 10 Media และ BG-11 Media โดยเลี้ยงใส่หลอดทดลองหรือขวดรูปชมพู่ เป็นเวลา 7 วัน และเก็บไว้เป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์เพื่อการใช้ประโยชน์ต่อยอดขั้นสูงต่อไป

3.3 วิธีการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของพืช

1) ทำการสุ่มพื้นที่เก็บตัวอย่างด้วยวิธีการ Stratified random อย่างน้อย 10 พื้นที่ โดยต้องครอบคลุมทุกสังคมพืช

2) ออกสำรวจ และเก็บตัวอย่างพืชทุกเดือน ตามพื้นที่สุ่มเก็บตัวอย่าง บันทึกข้อมูลภาคสนามอย่างละเอียด

3) แยกตัวอย่างพรรณไม้ ออกเป็นสองส่วน ส่วนที่หนึ่งเก็บรักษาในรูปแบบตัวอย่างดอง หรือตัวอย่างแห้ง เก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่ห้องปฏิบัติการเก็บรวบรวมพรรณไม้ท้องถิ่น สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี

4) ส่วนที่สอง นำมาบรรยาย และตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของพืชที่พบอย่างละเอียดตามหลักพฤกษอนุกรมวิธาน

5) วิเคราะห์หาชื่อวิทยาศาสตร์ โดยใช้ Dichotomous key จากหนังสือพรรณพฤกษชาติของประเทศไทย (Flora of Thailand) และนำตัวอย่างพรรณไม้ไปเปรียบเทียบกับตัวอย่างพรรณไม้แห้งในพิพิธภัณฑ์พืชสากล

3.4 อุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือวิจัยในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1) หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ใช้นึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารวุ้นโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2) ตู้อบความร้อนแห้ง ใช้ในการฆ่าเชื้อเครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆโดยใช้อุณหภูมิ 180 °C เป็นเวลา 2 ชม.

3) ตู้อบไมโครเวฟ ใช้สาหรับหลอมวุ้น

4) เครื่องชั่งอย่างหยาบ (ทศนิยม 2 ตำแหน่ง)

5) เครื่องชั่งอย่างละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)

6) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter)

7) ถังเก็บน้ำกลั่น

8) ขวดใส่ Stock อาหาร

9) กระบอกตวง (Cylender) ขนาด 100 500 และ 1,000 มล.

10) บีกเกอร์ขนาด 30 50 150 250 600 และ 1,000 มล.

11) ปิเปต (Pipette) ขนาด 1 5 และ 10 มล.

12) แท่งแก้วคนสาร

13) ช้อนตักสาร

14) กระดาษชั่งสารเคมี

15) กระดาษ Label

วิธีดำเนินการวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชหายาก

สารเคมีในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1) สารสาหรับเตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog, 1962 (MS)

2) สารประกอบอินทรีย์ที่ใช้ร่วมกับอาหารเพาะเลี้ยง ได้แก่ น้าตาลซูโครส และผงวุ้น

3) สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ Naphthalene acetic acid (NAA) และBenzyladenine (BA)

4) สารเคมีที่ใช้สาหรับปรับความเป็นกรด–ด่าง ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล

2. สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ

1) เอธิลแอลกอฮอล์ 70%

2) เอธิลแอลกอฮอล์ 95%

เครื่องมือที่ใช้ในการย้ายชิ้นส่วน

1) ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) ที่ใช้ในการย้ายชิ้นส่วนพืช

2) ตะแกรงสาหรับวางอุปกรณ์

3) ตะเกียงแอลกอฮอล์

4) ขวด พร้อมฝาปิด

5)จานแก้ว (Petridish)

6) ปากคีบ (Forcep)

7) มีดผ่าตัดเบอร์ 3 และเบอร์ 4

8) ผ้าสะอาดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

9) ขวดบรรจุอาหารที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

เครื่องมือที่ใช้ในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Culture room)

1) ชั้นวางขวดสาหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2) เครื่องปรับอากาศ

3) เทอร์โมมิเตอร์สาหรับวัดอุณหภูมิ

สภาพแวดล้อมภายในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1) ความเข้มของแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ 3,000 ลักซ์

2) ช่วงแสง 16 ชม./วัน

3) อุณหภูมิ 25±2 ℃

การทดลองที่ 1 การฟอกฆ่าเชื้อและการงอกของผลอ่อนมะนาวป่าที่ได้จากการผสมเกสรตามธรรมชาติในเดือนพฤษภาคมและเดือนกรกฎาคม

นำผลอ่อนมะนาวป่า *Atalantiamonophylla* (DC.) Correa ที่ได้จากการผสมเกสรตามสภาพธรรมชาติในช่วงเดือนพฤศจิกายน- เดือนธันวาคม มาใช้ในการทดลองตามระยะเวลาที่เก็บต่างกัน 2ระยะคือ เดือนพฤษภาคม และกรกฎาคม มาฟอกฆ่าเชื้อด้วยการชุบผลอ่อนนั้นด้วยแอลกอฮอล์ 70% ประมาณ 3 นาทีก่อนนำเข้าตู้ปลอดเชื้อ จุ่มแอลกอฮอล์ 95% จากนั้นเผาไฟ 1 ครั้งก่อนนำไปวางบนจานแก้วที่รองด้วยกระดาษที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใช้มือข้างซ้ายจับปากคีบที่บริเวณผิวเปลือกมะนาวป่าไว้แล้วใช้ใบมีดเชือนตัดส่วนท้ายออกเล็กน้อย ซึ่งเทคนิคการแกะเมล็ดออกจากผลอ่อนให้ปลอดเชื้อทำได้ดังนี้

1) สังเกตหาร่องผลซึ่งจะมีทั้งหมด 3 ร่องจรดปลายมีดที่อยู่ในมือขวาลงบนปลายผลให้มีดอยู่บนแนวร่องผลร่องใดร่องหนึ่งก่อน ค่อย ๆ จรดใบมีดลงบริเวณผิวเปลือกถัดเข้าไปในเนื้อร่องเพียงเล็กน้อยให้ระยะรองรับขั้วผลพอดี

2) จรดปลายมีดลงให้เลยจุดที่เป็นขั้วผลไปด้านหน้า 1-2 มม. จากนั้นจรดบริเวณปลายมีดเข้าหาตัวเล็กน้อย เพื่อให้คมมีดตัดผลในลักษณะที่ไม่โดนเมล็ด

3) เมื่อเปลือกแยกออกจากกันจะเผยให้เห็นเมล็ดที่ 1 ต้องไม่ให้มือหรือมีดสัมผัสเมล็ดเป็นอันขาด หากสามารถใช้ปากคีบคีบเมล็ดออกได้ก็ให้ใช้มืออีกด้านถือปากคีบคีบเมล็ดออกไปใส่ลงในขวดอาหารสาหรับเพาะเลี้ยงบรรจุอยู่ เมื่อได้เมล็ดที่ 1 แล้วต้องทาการตัดต่อไปจนครบทั้ง 3 เมล็ดทั้ง 3 เมล็ดเหล่านี้อาจมีเมล็ดดีเพียง 1-2 เมล็ด หรือไม่มีเลยดังนั้นจึงต้องสังเกตเอาเมล็ดที่สมบรูณ์เท่านั้น

4) การสังเกตลักษณะเมล็ด เมล็ดดีจะมีลักษณะขาวขุ่นและมีขนาดใหญ่ เวลาคีบจะรู้สึกแข็งและมีเมล็ดอยู่ภายใน ในขณะที่เมล็ดไม่ดีจะมีลักษณะใสและส่วนใหญ่มีขนาดเล็ก บางครั้งก็มีขนาดใหญ่และขาวขุ่นแต่ไม่มีเมล็ดอยู่ข้างใน เวลาคีบจะมีน้ำแตกออกมาซึ่งลักษณะดังกล่าวจะใช้ได้เฉพาะเมล็ดอ่อนที่เก็บในเดือนตุลาคมและธันวาคมเท่านั้น ส่วนผลอ่อนที่เก็บในเดือนมีนาคม พฤษภาคม และกรกฎาคม สังเกตจากเมล็ดที่มีขนาดใหญ่ที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดข้างเคียง

5) เมื่อได้เมล็ดแล้วใช้ปากคีบแกะเปลือกหุ้มเมล็ดออก 2 ชั้นเพื่อช่วยให้เมล็ดงอก ซึ่งการแกะเปลือกออกอาจทาทันที หรือรออีก 1 สัปดาห์ค่อยเปิดฝาขวดแล้วลนปากขวดใช้ปากคีบแกะออกก็ได้ การแกะทันทีจะทาได้ยากกว่าการรออีก 1 สัปดาห์ ซึ่งเปลือกจะแกะออกได้ง่ายกว่า ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 4 และ 6 สัปดาห์ภายใต้อุณหภูมิ 25±2 ℃ ให้แสง 16 ชม./วัน ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ เมื่อเมล็ดเริ่มงอกจะสังเกตเห็นเมล็ดมีสีเขียว เพาะเลี้ยงต่อไปจนกระทั่งเมล็ดเจริญเป็นต้นและรากตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อและเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเนื้อเยื่อพืช (จานรรจ์, 2545) เก็บรวบรวมข้อมูลโดยตรวจนับเปอร์เซ็นต์การงอกและการเจริญพัฒนา นำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อหาสูตรอาหารที่ดีที่สุดตรวจวัดการเจริญโดยการวัดความยาวรากเฉลี่ยของมะนาวป่า แล้ววิเคราะห์ผล

ทางสถิติเพื่อหาสูตรอาหารที่ดีที่สุดวางแผนแบบสุ่มตลอด (complete randomized design, CRD) ทาจำนวน 12 ซ้ำต่อ 1 หน่วยการทดลอง (treatment) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) โดยโปรแกรม SPSS รุ่นที่ 16 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด NAA ร่วมกับ BA ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เมล็ดอ่อนของมะนาวป่าเจริญและพัฒนาเป็นต้นและราก

นำผลอ่อนที่ได้จากการฟอกฆ่าเชื้อจากการทดลองที่ 1 มาศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0 0.1 และ 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้น 0 0.5 1.0 และ 2.0 มก./ล. ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เมล็ดอ่อนของมะนาวป่าสามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นและรากที่สมบูรณ์ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ระดับสารควบคุมการเจริญชนิด NAA ร่วมกับ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร) ในอาหารสูตร MS (1962)

NAA (mg/l) / BA (mg/l)	0	0.1	0.5
0	NB1	NB2	NB3
0.5	NB4	NB5	NB6
1	NB7	NB8	NB9
2	NB10	NB11	NB12

เก็บรวบรวมข้อมูล โดยตรวจนับเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต การงอกและการเจริญพัฒนานำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อหาสูตรอาหารที่ดีที่สุดตรวจวัดการเจริญโดยการวัดความยาวรากเฉลี่ยของมะนาวป่า เก็บผลการศึกษาที่ 12 4 6 สัปดาห์ แล้ววิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อหาสูตรอาหารที่ดีที่สุดวางแผนแบบสุ่มตลอด (complete randomized design, CRD) ทำจำนวน 12 ซ้ำต่อ 1 หน่วยการทดลอง (treatment) นาข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)โดยโปรแกรม SPSS รุ่นที่ 16 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 3 การศึกษาอัตราการรอดชีวิตของต้นอ่อนมะนาวป่า เมื่อนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ

นำต้นอ่อนมะนาวป่าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในการทดลองที่ 2 ที่มีลักษณะใบและรากสมบูรณ์มาปรับสภาพก่อนนาออกปลูก ด้วยการวางขวดเพาะเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา2 สัปดาห์ จากนั้นจึงทาการย้ายออกจากขวดเพาะเลี้ยง ล้างวุ้นที่ติดอยู่บริเวณปลายรากและใบออกให้สะอาด นำไปเพาะเลี้ยงบนวัสดุปลูกที่เปรียบเทียบวัสดุปลูกทั้ง7 ชนิด คือ ดินดีพร้อมปลูกดินตราดอกลำดวนดิน

ตราหัววัว ดินลำดวน ดินตราดอกบัว ทราย และพิทมอสโดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 4 และ 6 สัปดาห์ เพื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิต ความสูงเฉลี่ย จำนวนใบเฉลี่ยต่อต้น ความยาวใบเฉลี่ยต่อต้นและความกว้างใบเฉลี่ยต่อต้น

เก็บรวบรวมข้อมูล โดยตรวจนับเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และการเจริญพัฒนานำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อหาชนิดของวัสดุปลูกที่ดีที่สุดตรวจวัดการเจริญโดยการวัดความยาวรากเฉลี่ยของมะนาวป่า เก็บผลการศึกษาที่ 2 4 6 สัปดาห์ แล้ววิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อหาสูตรอาหารที่ดีที่สุด วางแผนแบบสุ่มตลอด (complete randomized design, CRD) ทำจำนวน 12 ซ้ำต่อ 1 หน่วยการทดลอง(treatment) นาข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test (DMRT) โดยโปรแกรม SPSS รุ่นที่ 16 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.5 สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

- อ่างเก็บน้ำเขื่อนสิรินธร จังหวัดอุบลราชธานี
- ห้องปฏิบัติการสาหร่าย ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และห้องปฏิบัติการอนุกรมวิธานพืช สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี

3.6 ระยะเวลาในการดำเนินงาน

ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ.2554 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2555