

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 พรรณไม้ที่ทดลอง

จีนเนื้อเยื่อส่วนยอดของพรรณไม้น้ำอเมซอนแอฟริกาที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 64 ยอด และพรรณไม้น้ำอเมซอนแอฟริกาอายุ 6 สัปดาห์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จำนวน 720 ต้น (ภาพที่ 3.1)

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ

3.2.2 โรงเรือนพรรณไม้น้ำแบบกึ่งปิดขนาด 6×12 เมตร

3.2.3 ชุดเครื่องมือและอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ภาคผนวก ก.)

3.2.4 ชุดรางปลูกแบบ DFT ยาว 3 เมตร จำนวน 12 ราง ทำจากท่อ PVC สีขาว ขนาด 2 นิ้ว เจาะช่องปลูกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 นิ้ว จำนวน 20 ช่อง โดยมีระบบหมุนเวียนสารละลายธาตุอาหาร (ภาพที่ 3.2)

3.2.5 สารละลายธาตุอาหารที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียม 0, 0.4, 0.8 และ 1.2 มิลลิโมลต่อลิตร (ภาคผนวก ข.)

3.2.6 ชุดเครื่องมือและสารเคมีสำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำ (ภาคผนวก ค.1)

3.2.7 ชุดเครื่องมือและสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ธาตุอาหารพืชตามวิธีของปรีดา ปากเพียร และคณะ (2536) (ภาคผนวก ง.)



ภาพที่ 3.1 พรรณไม้น้ำอะซอนแอฟริกา อายุ 6 สัปดาห์ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



ภาพที่ 3.2 ชุดรางปลูกพืชไร้ดินแบบ DFT

3.3 วิธีดำเนินการ

3.3.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA (α -naphthaleneacetic acid) ร่วมกับ BA (6-benzyladenine) ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนต้นอ่อนของอเมซอนแอฟริกา

3.3.1.1 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ 4x4 factorial in CRD โดยมีปัจจัยศึกษา (factors) 2 ปัจจัย คือ สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 4 ระดับ ได้แก่ 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 4 ระดับ ได้แก่ 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเหลวสูตรพื้นฐาน (MS) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 16 ชุดการทดลองๆ ละ 4 ซ้ำ ดังนี้

- ชุดการทดลองที่ 1 ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ชุดควบคุม)
- ชุดการทดลองที่ 2 เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว
- ชุดการทดลองที่ 3 เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว
- ชุดการทดลองที่ 4 เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว
- ชุดการทดลองที่ 5 เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว
- ชุดการทดลองที่ 6 เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ชุดการทดลองที่ 7 เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ชุดการทดลองที่ 8 เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ชุดการทดลองที่ 9 เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว
- ชุดการทดลองที่ 10 เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ชุดการทดลองที่ 11 เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ชุดการทดลองที่ 12 เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ชุดการทดลองที่ 13 เติม NAA 3 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว
- ชุดการทดลองที่ 14 เติม NAA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ชุดการทดลองที่ 15 เติม NAA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ชุดการทดลองที่ 16 เติม NAA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

โดยทำการทดลองเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

3.3.1.2 วิธีการทดลอง

1. นำชิ้นส่วนยอดของต้นอเมซอนแอฟริกา ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว (ภาคผนวก ก.1) มาปลูกในอาหารสูตรพื้นฐาน (Murashige and Skoog, 1962) (ตารางผนวกที่ ก. 1) เลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์

ความเข้มแสง 1,100-1,300 ลักซ์ วันละ 12 ชั่วโมง (6.00 น.-18.00 น.) เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ จึงนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

2. นำต้นอ่อนปลอดเชื้อของอเมซอนแอฟริกาอายุ 4 สัปดาห์ มาตัดแยกชิ้นส่วนยอดลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรพื้นฐาน ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ระดับความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ระดับความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใส่ขวดละ 1 ชิ้น ระดับละ 4 ซ้ำ

3. นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 1,100-1,300 ลักซ์ วันละ 12 ชั่วโมง (6.00 น.-18.00 น.) เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

3.3.1.3 การเก็บข้อมูล

1. นับจำนวนต้นอ่อนที่เกิดขึ้นใหม่ทุกสัปดาห์ และบันทึกผล
2. บันทึกความสูงของต้นพรรณไม้น้ำ เพอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่ เพอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนที่มีชีวิตแต่ไม่เกิดยอดใหม่ และเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนที่ตาย เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

3.3.2 การทดลองที่ 2 การทดลองหาระดับของไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของอเมซอนแอฟริกา ในระบบการปลูกพืชไร้ดินแบบ DFT

3.3.2.1 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ CRD (completely randomized design) โดยมีความเข้มข้นของไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียม 4 ระดับ เป็นปัจจัยในการทดลอง ได้แก่ 0, 0.4, 0.8 และ 1.2 มิลลิโมลต่อลิตร (ภาคผนวก ข.1-ข.4) ระดับละ 3 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ความเข้มข้นของแอมโมเนียม 0 มิลลิโมลต่อลิตร

ชุดการทดลองที่ 2 ความเข้มข้นของแอมโมเนียม 0.4 มิลลิโมลต่อลิตร

ชุดการทดลองที่ 3 ความเข้มข้นของแอมโมเนียม 0.8 มิลลิโมลต่อลิตร

ชุดการทดลองที่ 4 ความเข้มข้นของแอมโมเนียม 1.2 มิลลิโมลต่อลิตร

โดยทำการทดลองเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

3.3.2.2 วิธีการทดลอง

1. นำพรรณไม้น้ำอเมซอนแอฟริกาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากการทดลองที่ 1 (อายุ 6 สัปดาห์) ตัดแยกเป็นต้นเดี่ยวล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออกให้หมด ตัดรากและใบออกบางส่วนเพื่อเร่งให้รากใหม่งอกเร็วขึ้น พันด้วยฟองน้ำ ใส่ในถ้วยปลูก อนุบาลบนโฟมที่ลอยน้ำ คลุมด้วยพลาสติกใส เพื่อควบคุมความชื้น หลังจากนั้นลดความชื้นลงโดยการเปิดพลาสติกคลุมเพียงบางส่วน เพื่อให้พรรณไม้น้ำสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีความชื้นปกติ เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์

2. นำพรรณไม้น้ำอเมซอนแอฟริกาที่มีความยาวของลำต้นและจำนวนของใบที่ใกล้เคียงกันจำนวน 240 ต้นไปทดลองเลี้ยงในระบบ DFT ซึ่งมีสารละลายธาตุอาหารที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมที่แตกต่างกันทั้ง 4 ระดับๆ ละ 3 ชั่วโมง จำนวนพรรณไม้น้ำจะ 20 ต้น โดยปรับให้มีค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายเท่ากับ 1.0 มิลลิซีเมนต่อเซนติเมตร และค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 7.0 – 7.5 ในทุกชั่วโมง ซึ่งในระหว่างการทดลองจะมีการรักษาระดับของความ เป็นกรดเป็นด่างในสารละลายธาตุอาหารให้คงที่ โดยใช้สารละลายกรดไนตริก 10 เปอร์เซ็นต์ และ สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์ และมีการเติมน้ำเมื่อน้ำในถังสารละลายลดลง พร้อมทั้งปรับค่าการนำไฟฟ้าให้เท่ากับก่อนเติมน้ำ

3. วิเคราะห์คุณภาพน้ำทุกสัปดาห์ โดยพารามิเตอร์ที่ตรวจวัด ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายธาตุอาหาร ความเป็นกรดเป็นด่าง แอมโมเนีย-ไนโตรเจน ($\text{NH}_3\text{-N}$) ไนไตรท์-ไนโตรเจน ($\text{NO}_2\text{-N}$) ไนเตรท-ไนโตรเจน ($\text{NO}_3\text{-N}$) และ ฟอสฟอรัสที่ละลายในน้ำ (orthophosphate) (ภาคผนวก ก.2)

4. วิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารที่สะสมในรากและลำต้นของพรรณไม้น้ำเมื่อสิ้นสุดการทดลองตามวิธีของปรีดา พากเพียร และคณะ (2536) (ภาคผนวก ง.) ชั่วโมง 10 ต้น

3.3.2.3 การเก็บข้อมูล

1. ตรวจสอบการเจริญเติบโตของพรรณไม้น้ำทั้งก่อนและระหว่างการทดลองทุกๆ 2 สัปดาห์ ได้แก่ น้ำหนักต้น ความยาวใบ และความยาวลำต้น ชั่วโมง 4 ต้น

2. บันทึกปริมาณธาตุอาหารในพรรณไม้น้ำเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลองด้วยวิธีการวิเคราะห์ธาตุอาหารพืช

3.3.3 การทดลองที่ 3 การทดลองหาระดับของการนำไฟฟ้าที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของอเมซอนแอฟริกา ในระบบการปลูกพืชไร้ดินแบบ DFT

3.3.3.1 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ CRD (completely randomized design) โดยมีระดับของค่าการนำไฟฟ้าที่แตกต่างกัน 4 ระดับ เป็นปัจจัยในการทดลอง ได้แก่ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิซีเมนต่อเซนติเมตร ระดับละ 3 ชั่วโมง โดยมีวิธีการดำเนินการดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ระดับของค่าการนำไฟฟ้า 0.5 มิลลิซีเมนต่อเซนติเมตร

ชุดการทดลองที่ 2 ระดับของค่าการนำไฟฟ้า 1.0 มิลลิซีเมนต่อเซนติเมตร

ชุดการทดลองที่ 3 ระดับของค่าการนำไฟฟ้า 1.5 มิลลิซีเมนต่อเซนติเมตร

ชุดการทดลองที่ 4 ระดับของค่าการนำไฟฟ้า 2.0 มิลลิซีเมนต่อเซนติเมตร

โดยทำการทดลองเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

3.3.3.2 วิธีการทดลอง

1. นำพรรณไม้น้ำอเมซอนแอฟริกาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากการทดลองที่ 1 (อายุ 6 สัปดาห์) ตัดแยกเป็นต้นเดี่ยวลำอาหารเลี้ยงออกให้หมด ตัดรากและใบออกบางส่วนเพื่อเร่งให้รากใหม่งอกเร็วขึ้น พันด้วยฟองน้ำใสในถ้วยปลูก อนุบาลบนโฟมที่ลอยน้ำ คลุมด้วยพลาสติกใสเพื่อควบคุมความชื้น หลังจากนั้นลดความชื้นลงโดยการเปิดพลาสติกคลุมเพียงบางส่วน เพื่อให้พรรณไม้น้ำสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีความชื้นปกติ เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์

2. นำพรรณไม้น้ำอเมซอนแอฟริกาที่มีความยาวของลำต้นและจำนวนของใบที่ใกล้เคียงกัน จำนวน 240 ต้นไปทดลองเลี้ยงในระบบ DFT ซึ่งมีสารละลายธาตุอาหารที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนที่อยู่ในรูปของแอมโมเนียมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตจากการทดลองที่ 2 โดยปรับให้มีค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายธาตุอาหารที่แตกต่างกัน 4 ระดับๆ ละ 3 ชั่วโมง จำนวนพรรณไม้น้ำๆ ละ 20 ต้น และปรับความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 7.0 – 7.5 ในทุกชั่วโมง ซึ่งในระหว่างการทดลองจะมีการรักษาระดับของความเป็นกรดเป็นด่างในสารละลายธาตุอาหารให้คงที่ โดยใช้สารละลายกรดไนตริก 10 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์ และมีการเติมน้ำเมื่อระดับน้ำลดลงและเติมสารละลายธาตุอาหารให้มีระดับที่กำหนดไว้ตลอดการทดลอง

3. วิเคราะห์คุณภาพน้ำทุกสัปดาห์ โดยพารามิเตอร์ที่ตรวจวัด ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายธาตุอาหาร ความเป็นกรดเป็นด่าง แอมโมเนีย-ไนโตรเจน ($\text{NH}_3\text{-N}$) ไนไตรท์-ไนโตรเจน ($\text{NO}_2\text{-N}$) ไนเตรท-ไนโตรเจน ($\text{NO}_3\text{-N}$) และ ฟอสฟอรัสที่ละลายในน้ำ (orthophosphate) (ภาคผนวก ก.2)

4. วิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารที่สะสมในรากและลำต้นของพรรณไม้น้ำเมื่อสิ้นสุดการทดลองตามวิธีของปรีดา พากเพียร และคณะ (2536) (ภาคผนวก ง.) ชั่วโมง 10 ต้น

3.3.3.3 การเก็บข้อมูล

1. ตรวจสอบการเจริญเติบโตของพรรณไม้น้ำทั้งก่อนและระหว่างการทดลองทุกๆ 2 สัปดาห์ ได้แก่ น้ำหนักต้น ความยาวใบ และความยาวลำต้น ชั่วโมง 4 ต้น

2. บันทึกบันทึกปริมาณธาตุอาหารในพรรณไม้น้ำเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลองด้วยวิธีการวิเคราะห์ธาตุอาหาร

3.3.4 การทดลองที่ 4 การทดลองหาระดับของค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของอเมซอนแอฟริกาในระบบการปลูกพืชไร้ดินแบบ DFT

3.3.4.1 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ CRD (completely randomized design) โดยมีระดับของความเป็นกรดเป็นด่าง ที่แตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นปัจจัยในการทดลอง ได้แก่ 5.0-5.5, 6.0-6.5 และ 7.0-7.5 ระดับละ 4 ชั่วโมง โดยมีวิธีการดำเนินการดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ระดับของค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.0-5.5

ชุดการทดลองที่ 2 ระดับของค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 6.0-6.5

ชุดการทดลองที่ 3 ระดับของค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 7.0-7.5

โดยทำการทดลองเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

3.3.4.2 วิธีการทดลอง

1. นำพรรณไม้น้ำอเมซอนแอฟริกาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากการทดลองที่ 1 ตัดแยกเป็นต้นเดี่ยวล้างอาหารเลี้ยงออกให้หมด ตัดรากและใบออกบางส่วนเพื่อเร่งให้รากใหม่งอกเร็วขึ้น พันด้วยฟองน้ำใส่ในถ้วยปลูก อนุบาลบนโฟมที่ลอยน้ำ คลุมด้วยพลาสติกใส เพื่อควบคุมความชื้น หลังจากนั้นลดความชื้นลงโดยการเปิดพลาสติกคลุมเพียงบางส่วน เพื่อให้พรรณไม้น้ำสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีความชื้นปกติ เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์

2. นำพรรณไม้น้ำอเมซอนแอฟริกาที่มีความยาวของลำต้นและจำนวนของใบที่ใกล้เคียงกัน จำนวน 240 ต้นไปทดลองเลี้ยงในระบบ DFT ซึ่งมีสารละลายธาตุอาหารที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนที่อยู่ในรูปของแอมโมเนียมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตจากการทดลองที่ 2 และค่าการนำไฟฟ้าที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 3 โดยปรับให้มีความเป็นกรดเป็นด่างในสารละลายธาตุอาหารให้มีระดับที่แตกต่างกัน 3 ระดับๆ ละ 4 ชั่วโมง พรรณไม้น้ำชำละ 20 ต้น ซึ่งในระหว่างการทดลองจะมีการรักษาระดับของความเป็นกรดเป็นด่างในสารละลายธาตุอาหารให้คงที่ โดยใช้สารละลายกรดไนตริก 10 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์ และมีการเติมน้ำเมื่อระดับน้ำลดลงและเติมสารละลายธาตุอาหารให้มีระดับที่กำหนดไว้ตลอดการทดลอง

3. วิเคราะห์คุณภาพน้ำทุกสัปดาห์ โดยพารามิเตอร์ที่ตรวจวัด ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายธาตุอาหาร ความเป็นกรดเป็นด่าง แอมโมเนีย-ไนโตรเจน ($\text{NH}_3\text{-N}$) ไนไตรท์-ไนโตรเจน ($\text{NO}_2\text{-N}$) ไนเตรท-ไนโตรเจน ($\text{NO}_3\text{-N}$) และ ฟอสฟอรัสที่ละลายในน้ำ (orthophosphate) (ภาคผนวก ก.2)

4. วิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารที่สะสมในรากและลำต้นของพรรณไม้น้ำเมื่อสิ้นสุดการทดลองตามวิธีของปรีดา พากเพียร และคณะ (2536) (ภาคผนวก ง.) ชำละ 10 ต้น

3.3.4.2 การเก็บข้อมูล

1. บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตของพรรณไม้น้ำทั้งก่อนและระหว่างการทดลองทุกๆ 2 สัปดาห์ ได้แก่ น้ำหนักต้น ความยาวใบ และความยาวลำต้น ชำละ 4 ต้น

2. บันทึกปริมาณธาตุอาหารในพรรณไม้น้ำเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลองด้วยวิธีการวิเคราะห์ธาตุอาหารพืช

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองด้วยวิธี LSD จากโปรแกรม SPSS 11.0 for windows

3.5 สถานที่ทำการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ โรงเรียนพรรณไม้น้ำ และห้องปฏิบัติการ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2. ห้องปฏิบัติการภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.6 ระยะเวลาในการทำวิจัย

เดือนตุลาคม 2548 – เดือนมกราคม 2550