

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนการเตรียมการทดลอง

3.1 พืชที่ใช้ในการทดลอง

ผลแก่ของลูกลำพู (*Sonneratia caseolaris*) จากหน่วยปฏิบัติการป่าชายเลนที่ 1 ส่วนการจัดการป่าชายเลน ป่าพรุและพื้นที่ชุ่มน้ำ จ.ตราด โดยผลแก่จะนิ่มและมีกลิ่นค่อนข้างแรง ดังภาพที่

3.1 ผลแก่ของลำแพน (*Sonneratia alba*) จากศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน จ.จันทบุรี โดยผลแก่จะมีลักษณะของกลีบรองดอกโค้งออก หรือฐานรองดอกหลุดออกจากผล ดังภาพที่ 3.2

3.2 เตรียมพื้นที่ในการทดลอง

เตรียมกระถางพลาสติกขนาด 15x15x10 cm³ บรรจุทรายเป็นวัสดุปลูก วางในกระบะพลาสติกขนาด 40x60x40 cm³ จำนวน 6 กระถางต่อกระบะที่บรรจุน้ำที่มีความเค็มต่างๆ ที่มีระดับความสูงของน้ำเท่ากับระดับทรายในกระถาง ดังภาพที่ 3.3 ง นำไปวางในเรือนทดลอง ภาควิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เรือนทดลองมุงด้วยแผ่นอะคริลิกที่ให้แสงผ่านได้ 98% ดังภาพที่ 3.3 จ

3.3 การปลูกลำพูและลำแพน

นำผลแก่ลำพูและลำแพน ล้างเอาเมล็ด ดังภาพที่ 3.3 ก-ข นำเมล็ดไปปลูกในกระถางพลาสติกขนาด 15x15x10 cm³ จำนวน 50 เมล็ดต่อกระถาง โดยใช้ทรายเป็นวัสดุปลูก ดังภาพที่ 3.3 ค จากนั้นนำกระถางพลาสติกวางลงในกระบะพลาสติกขนาด 40x60x40 cm³ จำนวน 6 กระถางต่อกระบะ ประกอบด้วยไม้ทั้ง 2 ชนิดจำนวน 3 ซ้ำ ทำการทดลองโดยให้น้ำที่มีระดับความเค็ม 2 แบบ คือ

แบบที่ 1 ให้น้ำที่มีระดับความเค็ม 11 ระดับความเข้มข้น คือ 0 3 5 7 10 12 15 20 25 30 และ 35 ppt ที่เตรียมจากน้ำนาเกลือที่มีความเค็มประมาณ 120 ppt ทำให้เจือจางโดยการผสมกับน้ำประปาให้ได้ความเค็มตามที่ต้องการตลอดการทดลอง โดยแต่ละกระบะให้น้ำเต็มประมาณ 10 ลิตร ชั่งน้ำไว้ประมาณ 1 สัปดาห์และรักษาระดับน้ำให้คงที่ โดยตรวจวัดความเค็ม

ด้วยเครื่อง Hand Refractometer จากนั้นจึงปล่อยน้ำออกแล้วใส่น้ำเค็ม ลงไปใหม่ ทำซ้ำทุกๆ สัปดาห์จนต้นกล้าเริ่มแตกใบอ่อนคู่แรก

แบบที่ 2 ให้นำประปาในการเพาะจนได้เป็นต้นกล้าเริ่มแตกใบอ่อนคู่แรก จึงเปลี่ยนมาให้ ความเค็ม 11 ระดับความเข้มข้นคือ 0 3 5 7 10 12 15 20 25 30 และ 35 ppt โดยค่อยๆ เพิ่ม ความเค็ม 5 ppt ทุก 2 วัน จนถึงระดับที่กำหนดเพื่อป้องกันการกระทบกระเทือนจากการที่พืชได้รับความเค็มมากในทันที โดยแต่ละกระบะให้น้ำเค็มประมาณ 10 ลิตร

ทั้ง 2 แบบการทดลองวางอยู่ในเรือนทดลองที่มุงด้วยแผ่นอะคริลิกที่ให้แสงผ่านได้ 98% โดยในระยะแรกใช้ตาข่ายพรางแสง 70% คลุมไว้ด้วยจนเมื่อต้นกล้าเริ่มแตกใบอ่อนคู่แรก จึงเอาออก และให้สารละลายธาตุอาหาร Hoagland ความเข้มข้น half-strength ปริมาณ 10 ลิตรกับพืชทุกๆ กระบะ ทำการตรวจความเค็มของน้ำแต่ละกระบะทุกวัน รักษาระดับน้ำให้คงที่และ ระบายน้ำ ออกจากกระบะทุกๆ 2 สัปดาห์ทำการทดลองเป็นเวลา 6 เดือน

3.4 การศึกษาการงอกและอัตราการรอดตายในสภาวะความเค็มต่างๆกัน

4.1 บันทึกอัตราการงอกของลำพูและลำแพน โดยพิจารณาจากการงอกออกมาเป็นต้น กล้าที่สมบูรณ์ และนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การงอกเมื่อได้รับอิทธิพลจากความเค็มของน้ำต่างๆ กันคือ 0 3 5 7 10 12 15 20 25 30 และ 35 ppt

4.2 บันทึกอัตราการรอดตายตลอดช่วงของการทดลอง หรือจนกระทั่งอัตราการรอดตาย คงที่โดยบันทึก ผลของอัตราการรอดตายเป็น 2 ช่วง คือ

4.2.1 ช่วงเพาะเมล็ดจนเป็นต้นกล้าที่มีอายุ 2 เดือน โดยทำการเก็บผลทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

4.2.2 ช่วงเพาะเมล็ดจนเจริญเป็นต้นกล้าที่มีอายุ 6 เดือน โดยทำการเก็บผลทุก เดือนเป็นเวลา 6 เดือน

ทั้ง 2 แบบการทดลอง เพื่อเปรียบเทียบผลของความเค็มของน้ำช่วง 0 3 5 7 10 12 15 20 30 และ 35 ppt ที่มีต่ออัตราการรอดตายในช่วงที่เริ่มเพาะเมล็ดและช่วงที่เป็นต้นกล้าที่มีใบอ่อนคู่ แรกของลำพูและลำแพน

3.5 การศึกษาผลของความเค็มที่มีต่อการเจริญเติบโต

3.5.1 นำหนักแห้ง

เก็บตัวอย่างพืชเมื่อเริ่มแตกใบอ่อนคู่แรกจำนวน 5 ต้นต่อ 1 กระถาง นำมาแยกส่วน ราก ใบ และลำต้น อบแห้งในตู้อบตัวอย่างพืชที่อุณหภูมิ 80°C นาน 48 ชั่วโมงแล้วนำมาชั่งน้ำหนัก

แห้งด้วยเครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง และเก็บตัวอย่างพืชมาหาค่าน้ำหนักแห้งอีกครั้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (6 เดือน) ที่ระดับความเค็มต่างกันจำนวน 11 ระดับความเข้มข้นทั้ง 2 แบบการทดลองนำมาคำนวณหา

- น้ำหนักแห้ง ใบ ลำต้น และราก
- น้ำหนักแห้งรวม
- อัตราส่วนรากต่อต้น (Root :Shoot Ratio) ตามสมการ

$$\text{อัตราส่วนรากต่อต้น} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งราก}}{\text{น้ำหนักแห้งต้น}}$$

- อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (Relative Growth Rate) ตามสมการ

$$\text{PGR} = (\ln DW_2 - \ln DW_1) / (t_2 - t_1)$$

เมื่อ $DW_1 =$ น้ำหนักแห้งต้นที่เวลา t_1

$DW_2 =$ น้ำหนักแห้งต้นที่เวลา t_2 (Beadle, 1993)

3.5.2 ความสูง

วัดความสูงโดยเริ่มวัดเมื่อพืชเริ่มงอกและแตกใบอ่อนจนสิ้นสุดการทดลองทุก 1 เดือนเป็นเวลา 6 เดือน

3.6 การศึกษาผลของความเค็มที่มีต่อจำนวน พื้นที่และการร่วงของใบ

โดยทำการนับจำนวนใบและการร่วงของใบตั้งแต่พืชเริ่มงอกและแตกใบอ่อนจนสิ้นสุดการทดลองเป็นเวลา 6 เดือน และวัดพื้นที่ใบทุก 1 เดือนเป็นเวลา 6 เดือน

3.7 การศึกษาผลของความเค็มที่มีต่อการสะสมของ โซเดียมคลอไรด์ และโปแตสเซียมไอออน ที่ ราก ใบ และลำต้นของลำพูและลำแพน

3.7.1 วิเคราะห์ปริมาณ โซเดียม และโปแตสเซียม

นำส่วนของพืชคือ ราก ใบ และ ลำต้นที่เก็บเมื่อสิ้นสุดการทดลองมาอบที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และบดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันด้วยโกร่ง เมื่อจะวิเคราะห์ธาตุนำตัวอย่างพืชที่บดแล้วมาอบอีกครั้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ตัวอย่างแห้งน้ำหนักประมาณ 100 มิลลิกรัม มาย่อยด้วยกรดไนตริกและกรดเปอร์คลอริกตามวิธีของ Oweczkin และ Kerven (1980) จากนั้นใช้วิธี atomic absorption spectrophotometry ในการวิเคราะห์หาปริมาณ โซเดียม และ โปแตสเซียม นำน้ำเค็มความเข้มข้นต่างๆกัน และน้ำเค็มที่ผสมสารละลายอาหาร มาวิเคราะห์หาปริมาณ โซเดียมและโปแตสเซียมด้วยวิธีเดียวกัน เพื่อเปรียบเทียบผลการสะสมของปริมาณ โซเดียมและโปแตสเซียมในพืช

3.7.2 วิเคราะห์ปริมาณคลอไรด์

นำตัวอย่างแห้งน้ำหนักประมาณ 50 มิลลิกรัมใส่ในถ้วยกระเบื้อง เดิมสารละลายแคลเซียมออกไซด์ (CaO) ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรปริมาตร 1 มิลลิลิตรเพื่อป้องกันการระเหยของคลอไรด์ เผาตัวอย่างพืชในเตาเผาอุณหภูมิ 550 °C เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นนำเอาที่ได้ มาละลายด้วยน้ำกลั่น (ทัศนีย์ อัดตะนันท์ และคณะ, 2537) วิเคราะห์ปริมาณคลอไรด์ โดยวิธี Mercuric thiocyanate method ทำปฏิกิริยาโดยใช้ Chloride Reagent Set (HACH) วัดผลด้วยเครื่อง Spectrophotometer ตามวิธีใน Hach DR/2000 Spectrophotometer Procedures Manual (1988)

นำน้ำเต็มความเข้มข้นต่างๆ และน้ำเต็มที่ผสมสารละลายอาหาร มาวิเคราะห์หาปริมาณคลอไรด์ด้วยวิธีเดียวกัน เพื่อเปรียบเทียบผลการสะสมของปริมาณคลอไรด์ในพืช

3.8 ศึกษาทางกายวิภาคของราก ใบ และลำต้น เพื่อดูความแตกต่างเมื่อลำพูและลำแพนที่ได้รับ ความเค็มต่างๆกัน

นำชิ้นส่วนของพืชคือ ราก ใบ และ ลำต้นที่เก็บเมื่อสิ้นสุดการทดลอง มา Cross section โดยใช้เครื่อง microtome รุ่น Automatic MT-3 ให้มีความหนาประมาณ 6-7 ไมครอน นำมาศึกษา ดูความแตกต่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์

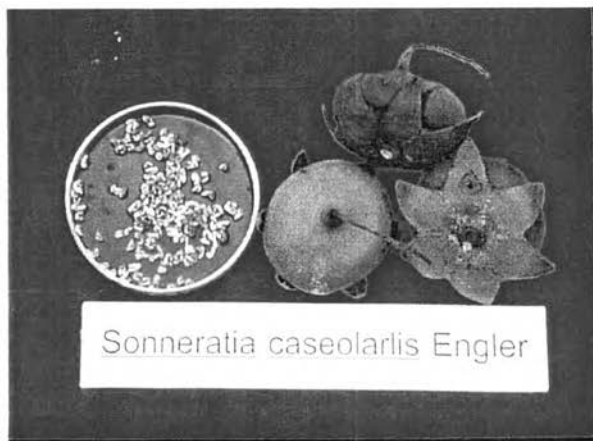
รากเปรียบเทียบจากลักษณะของเนื้อเยื่อชั้นผิว (epidermis) โดยใช้ส่วนของรากที่มีการเจริญขึ้นแรกบริเวณห่างจากปลายรากขึ้นมาประมาณ 1 เซนติเมตร

ต้นเปรียบเทียบจากลักษณะของมัดท่อลำเลียง (vascular bundle) โดยใช้ลำต้นบริเวณที่อยู่ห่างจากปลายยอดลงมาประมาณ 0.5 เซนติเมตร

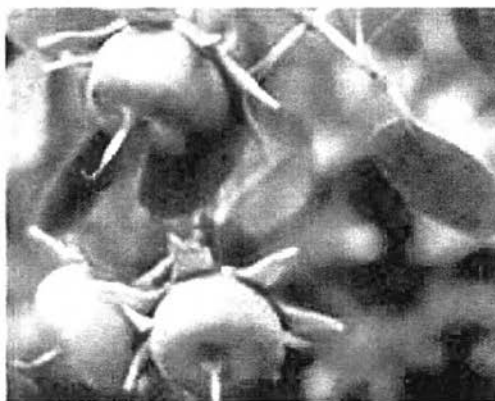
ใบเปรียบเทียบจากจำนวนของปากใบ (stomata)ต่อพื้นที่ โดยใช้ใบคู่ที่ 3 จากยอด ทำการเก็บภาพพิมพ์ผิวใบด้านบนและด้านล่างโดยใช้ lacquer (ยาทาเล็บ) ป้ายที่ผิวใบ (Noggle และ Fritz, 1977) เมื่อยาทาเล็บแห้งลอกภาพพิมพ์มาเตรียมสไลด์ ตรวจสอบดูกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 20 เท่า บันทึกผลด้วยภาพถ่าย

3.9 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ (Complete Randomized Design)จำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ Analysis of Variance และความแตกต่างโดยใช้ค่า Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 3.1 ผลและเมื่อดของลำพู



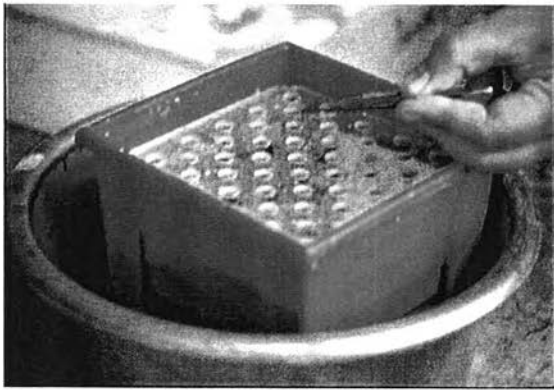
ภาพที่ 3.2 ผลและเมื่อดของลำแพน



ก



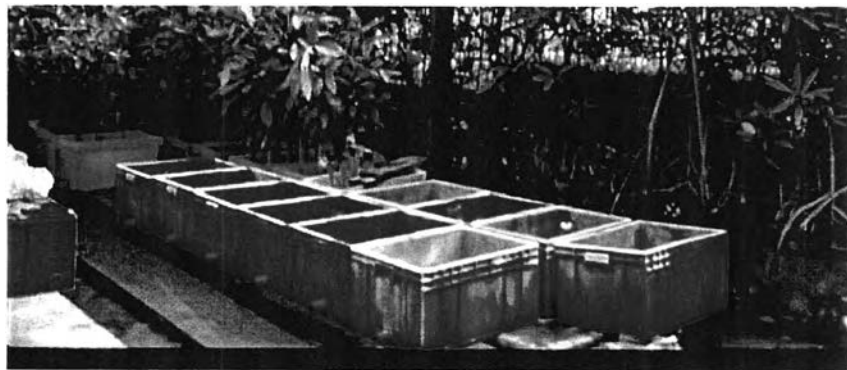
ข



ค



ง



จ

ภาพที่ 3.3 ขั้นตอนในการปลูก

ก. ตีแ่งเมล็ดลำพู

ข. แคะเมล็ดลำพูแพน

ค. เพาะในกระถาง

ง-จ. วางกระถางในกระบะที่มีน้ำความเค็มระดับต่างกัน