

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

##### เครื่องมือ

1. เครื่องกำเนิดโอโซน (Ozone generator)
2. เครื่องวัดปริมาณโอโซน (Ozone monitor) PHOTOMETRIC O<sub>3</sub> ANALYZER - MODEL 400E
3. เครื่องวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศ Gas Alert Micro-5 (IR)
4. เครื่องวัดความเข้มแสง (Lux meter)
5. เครื่องวัดอุณหภูมิ (Thermometer)
6. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
7. เครื่องตัดตัวอย่างแบบหมุน (Rotary microtome)
8. เครื่องฝังเนื้อเยื่อ (Embedding)
9. เครื่องอุ่นสไลด์ (Slide warmer)
10. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)
11. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning electron microscope)
12. เครื่องทำแห้งตัวอย่างแบบวิกฤต (Critical point dryer)

##### วัสดุอุปกรณ์

1. เมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60
2. Chamber ลักษณะเป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมจัตุรัสลักษณะโปร่งใส ขนาด 3x3x3 เมตร
3. ถ่านกัมมันต์ (Activated Charcoal) ขนาด 0.60 - 2.36 mm. (8x30 meshes)
4. โกร่งบดตัวอย่างใบพืช
5. ชุดฝังเนื้อเยื่อ

##### สารเคมี

1. Acetone 80%
2. Glacial acid
3. Formalin 2% และ 10%
4. Absolute Ethanol

5. Ethanol 50%, 70% และ 95%
6. t-Butyl alcohol
7. น้ำกลั่น
8. Paraffin wax
9. น้ำยา Haupt's adhesive
10. Xylene
11. สีย้อม safranin และ fast green
12. Glutaraldehyde 2.5%
13. Buffer solution (PBS)
14. Osmium tetroxide ( $\text{OsO}_4$ )

#### ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

##### 1. สถานที่ในการดำเนินการวิจัย

1.1 สถานที่ปฏิบัติงานภาคสนาม การวิจัยในครั้งนี้ใช้พื้นที่ปลูกถั่วเหลืองที่พิกัด  $16^{\circ} 44.003' \text{ N}$   $100^{\circ} 11.812' \text{ E}$  ในแปลงทดลองคณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก

1.2 สถานที่ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของใบ ณ ห้องปฏิบัติการภาควิชาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

##### 2. การควบคุมระดับก๊าซไอโซน

ในการวิจัยประยุกต์ใช้ตู้ทดลองระบบเปิดด้านบน (Open-top chamber; OTC) (กณิตา ธนเจริญชนภาส, 2551) ซึ่งมีลักษณะเป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมจัตุรัสมีหลังคาทรงสามเหลี่ยม คุมด้วยพลาสติกใส ขนาดกว้าง 3 เมตร ยาว 3 เมตร สูง 2 เมตร (ภาพ 11) เพื่อควบคุมระดับความเข้มข้นของไอโซนให้แตกต่างกัน 3 ระดับ ใน 3 ชุดการทดลองดังนี้



ภาพ 11 Open-top chamber (ก่อนติดตั้งระบบไฟฟ้าเพื่อควบคุมระดับโอโซน)

## 2.1 การควบคุมระดับโอโซน

### 2.1.1 ระดับความเข้มข้นโอโซนต่ำกว่าระดับธรรมชาติ

ควบคุมระดับโอโซนโดยการดึงอากาศเข้ามาในตู้ทดลองโดยใช้พัดลมดูดอากาศจากภายนอกที่ระดับความสูง 1 เมตร ผ่านท่ออากาศ และอากาศที่ถูกดึงเข้ามาจะผ่านแผ่นกรองโอโซนและแผ่นกรองฝุ่น ทำให้ระดับโอโซนจะอยู่ในสภาวะที่ความเข้มข้นต่ำกว่าระดับธรรมชาติ ใช้ชื่อชุดทดลอง Charcoal – filtered (CF)

### 2.1.2 ระดับความเข้มข้นโอโซนเท่ากับสภาวะธรรมชาติ

ควบคุมระดับโอโซนโดยการดึงอากาศเข้ามาในตู้ทดลองโดยใช้พัดลมดูดอากาศจากภายนอกที่ระดับความสูง 1 เมตร ผ่านท่ออากาศ และอากาศที่ถูกดึงเข้ามาไม่ผ่านแผ่นกรองโอโซนและแผ่นกรองฝุ่น ทำให้ระดับโอโซนจะอยู่ในสภาวะที่ความเข้มข้นเทียบเท่ากับสภาวะระดับธรรมชาติ ใช้ชื่อชุดทดลอง Non - charcoal – filtered (NCF)

### 2.1.3 ระดับความเข้มข้นโอโซนเพิ่มสูงกว่าระดับธรรมชาติ

ควบคุมระดับโอโซนโดยการดึงอากาศเข้ามาในตู้ทดลองโดยใช้พัดลมดูดอากาศจากภายนอกที่ระดับความสูง 1 เมตร ผ่านท่ออากาศ และอากาศที่ถูกดึงเข้ามาจะผ่านแผ่นกรองโอโซนและแผ่นกรองฝุ่น พร้อมทั้งติดตั้งเครื่องผลิตโอโซน (Ozone generator) ซึ่งมีกำลังผลิต

300 mg/hr บริเวณด้านหน้าตู้ทดลอง ทำให้ระดับโอโซนอยู่ในสถานะที่ความเข้มข้นเพิ่มสูงกว่าระดับธรรมชาติ ใช้ชื่อชุดทดลอง charcoal – filtered + O<sub>3</sub> (CF<sup>+O3</sup>)

3. การตรวจวัดปัจจัยด้านกายภาพและเคมีในบรรยากาศบางประการ กำหนดระยะเวลาที่ทำการทดลองตั้งแต่เริ่มปลูกจนถึงระยะเก็บเกี่ยว และการตรวจวัดปัจจัยทางกายภาพในบรรยากาศภายในตู้ทดลองดังตาราง 3

ตาราง 3 ระยะเวลาการพ่นก๊าซโอโซนและการตรวจวัดปัจจัยทางกายภาพ

ระยะการเจริญเติบโต	อายุ (วัน)	จำนวนวันที่พ่นโอโซน
มีใบประกอบสองใบ (V2)	22	เริ่มพ่นโอโซน
มีใบประกอบสี่ใบ (V4)	30	9
เริ่มออกดอก (R1)	37	16
เริ่มติดฝัก (R3)	44	23
เริ่มติดเมล็ด (R5)	57	36
เริ่มเก็บเกี่ยว (R8)	76	55

### 3.1 ระดับโอโซน

ระดับก๊าซโอโซนในตู้ทดลอง โดยวัดเป็นหน่วย ppb โดยใช้เครื่องมือ

PHOTOMETRIC O<sub>3</sub> ANALYZER - MODEL 400E

### 3.2 ระดับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

ระดับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศ โดยวัดเป็นหน่วย ppb โดยใช้เครื่องมือ Gas Alert Micro-5 (IR) (BW technologies, Canada)

### 3.3 ระดับอุณหภูมิ

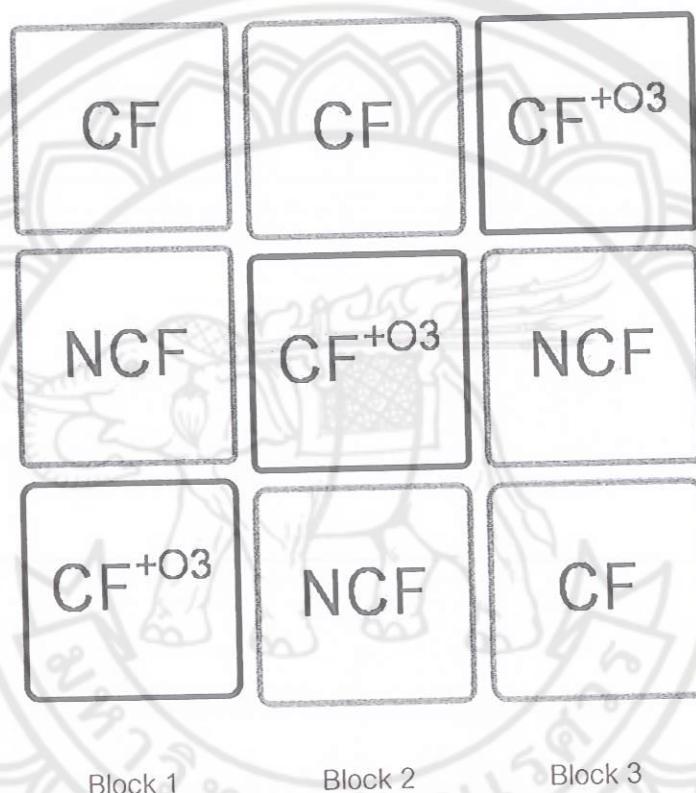
ระดับอุณหภูมิในบรรยากาศ โดยวัดเป็นองศาเซลเซียส

### 3.4 ระดับความเข้มแสง

วัดระดับความเข้มแสง โดยใช้เครื่องมือ Lux meter โดยวัดเป็นหน่วย Lux

#### 4. การวางแผนการทดลอง

กำหนดการวางแผนการทดลองให้มีจำนวน 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) ดังนั้นจำนวนตู้ทดลองทั้งหมดในการวิจัยมีจำนวน 9 ตู้ (ภาพ 12)



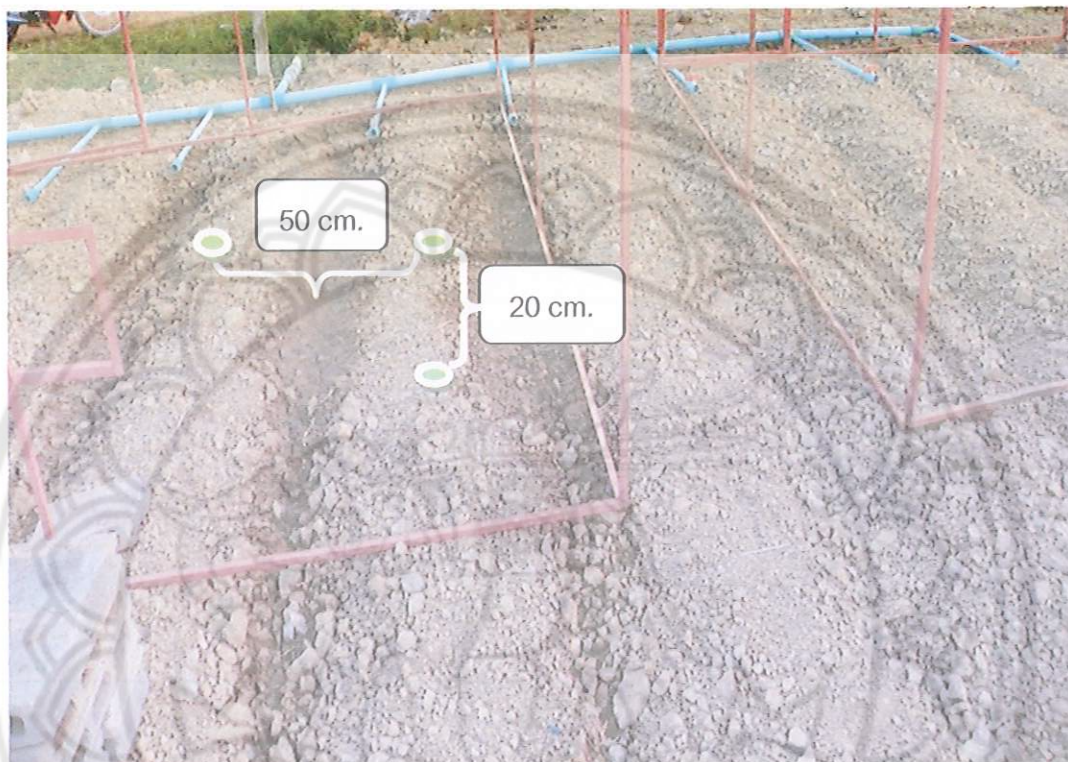
ภาพ 12 แผนผังการวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD)

#### 5. การจัดการปลูกถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่เลือกใช้สำหรับการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ เนื่องจากเป็นพืชที่ให้คุณค่าทางโภชนาการสูงและมีความไวต่อการสัมผัสโอโซน และเลือกพันธุ์เชียงใหม่ 60 เป็นพันธุ์เดียวสำหรับการศึกษา เนื่องจากเป็นพันธุ์ที่นิยมปลูกมากในเขตพื้นที่ภาคเหนือตอนล่าง

ปลูกถั่วเหลืองเป็นแถวจำนวนทั้งหมด 3 แถว มีระยะการปลูกระหว่างหลุม 50 x 20 เซนติเมตร (ภาพ 13) ก่อนปลูกใส่ปุ๋ยสูตร 12-24-12 อัตรา 10-15 กิโลกรัมต่อไร่ โดยหว่านปุ๋ยให้ทั่วแปลง (ใช้ 2 กิโลกรัมในพื้นที่ปลูกจริง 170 ตารางเมตร) ให้น้ำทุกๆ 7 วัน จากนั้นนำ Open-top chamber มาครอบต้นถั่วเหลือง ณ พื้นที่ปลูกเมื่อเข้าระยะเริ่มมีใบประกอบสองใบ (V2) คือ อายุ

ประมาณ 22 วัน โดยพ่นไอโซนเป็นเวลา 7 ชั่วโมงต่อวัน (09.00-16.00 น.) ทำการปลูกตั้งแต่เดือนมกราคม -เมษายน 2554



ภาพ 13 แปลงทดลองสำหรับปลูกถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60

## 6. การศึกษาปัจจัยชี้วัดผลกระทบของไอโซนที่มีต่อถั่วเหลือง

### 6.1 ระยะเวลาในการเลือกเก็บผลการศึกษา

ในการวิจัยกำหนดการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ผลโดยมีปัจจัยซึ่งเป็นดัชนีชี้วัดผลกระทบ ในช่วงระยะของอายุถั่วเหลืองในระยะต่างๆ (สมชาย บุญประดับ, 2543) การเจริญเติบโตวิเคราะห์จากการเจริญเติบโตทางลำต้น โดยวัดความสูง 6 ระยะ คือ ระยะที่มีใบประกอบสองใบ (V2) ระยะที่มีใบประกอบสี่ใบ (V4) ระยะเริ่มออกดอก (R1) ระยะเริ่มติดฝัก (R3) ระยะเริ่มติดเมล็ด (R5) และ ระยะเริ่มเก็บเกี่ยว (R8) ซึ่งเป็นช่วงอายุประมาณ 22, 30, 37, 44, 57 และ 76 วัน ตามลำดับ

### 6.2 ดัชนีพื้นที่ใบ (LAI คือ สัดส่วนของพื้นที่ใบพืช/พื้นที่ปลูกที่ครอบคลุมพืช 1 ต้น)

วัดดัชนีพื้นที่ใบโดยวัดความกว้างและความยาวของใบพืช ใช้ตามวิธีของ Ainsworth, et al. (2005) เพื่อคำนวณสูตรในการหา Leaf area index ของพืช สุ่มตัวอย่างพืช 10 ต้น โดยวัดจากใบที่มีสีเขียวทั้งต้น (เก็บตัวอย่างใบทั้งต้นจากต้นที่สุ่มที่มีใบเจริญเต็มที่โดยทำการวัดที่ใบย่อยกลาง) เพื่อใช้เปรียบเทียบประสิทธิภาพการรับแสงและสังเคราะห์แสง มีสมการดังนี้

$$LAI = LA/G$$

$$LA = 0.74 \times \text{กว้าง} \times \text{ยาว}$$

$$LA = \text{พื้นที่ใบรวมทั้งหมดใน 1 ต้น} \quad G = \text{พื้นที่ดินที่ครอบคลุมต้นถั่วเหลือง 1 ต้น}$$

### 6.3 ปริมาณรงควัตถุในใบ

วัดปริมาณรงควัตถุชนิด คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และแคโรทีนอยด์ โดยใช้วิธีของ Lichtenthaler and wellburn (1983)

### 6.4 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบ

ในแต่ละแปลงทดลอง สุ่มเก็บตัวอย่างใบ (ใบย่อยกลาง) จากต้นถั่วเหลืองจำนวน 10 ต้น ที่มีใบเจริญเต็มที่โดยเก็บตัวอย่างใบจากข้อที่ 5 นับจากปลายยอดลงมา ในแต่ละแปลงทดลอง บันทึกข้อมูลขนาด สี และลักษณะขนของใบ

### 6.5 ศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของใบ

โดยวิธีไมโครเทคนิคทางพืชด้วย paraffin technique ดัดแปลงวิธีของประศาสตร์ เกื้อมณี (2551) ธวัช ดอนสกุล (2534) และ Johansen (1940) บันทึกภาพด้วยโปรแกรม Motic Images plus 2.0

### 6.6 ลักษณะของปากใบ

ในแต่ละแปลงทดลองสุ่มเก็บตัวอย่างใบ (ใบย่อยกลาง) จากต้นที่มีใบเจริญเต็มที่โดยเก็บตัวอย่างใบจากข้อที่ 5 นับจากปลายยอดลงมา ล้างตัวอย่างใบพืชด้วยน้ำเปล่าให้สะอาด เช็ดให้แห้ง นำมาตัดให้มีขนาดประมาณ 0.5x0.5 เซนติเมตร นำชิ้นตัวอย่างพืชแช่ลงในสารละลาย FAA 70% แล้วนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราด (SEM) บันทึกลักษณะของปากใบ

## 7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปัจจัยและพารามิเตอร์ต่างๆ โดยการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ One-way ANOVA และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างชุดทดลอง โดยวิธีของ Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (ความเชื่อมั่น 95%)