

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

การศึกษานี้แบ่งการทดลองออกเป็น 5 การทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของการแช่หัวพันธุ์ด้วยสารพาโคลบิวทราโซลต่อการเติบโตของปทุมมาและกระเจียว

คัดเลือกหัวพันธุ์ปทุมมา จำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ เชียงใหม่พิงค์ และ ดอยตุงเรด ส่วนกระเจียว จำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ มณีสยาม และ บัวชั้น จากนั้นนำหัวพันธุ์ที่ได้มาทำการทดลอง โดยแช่หัวพันธุ์ นาน 24 ชั่วโมง ในสารละลายตามกรรมวิธีต่อไปนี้

- กรรมวิธีที่ 1 สารละลายพาโคลบิวทราโซล ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร
- กรรมวิธีที่ 2 สารละลายพาโคลบิวทราโซล ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร
- กรรมวิธีที่ 3 สารละลายพาโคลบิวทราโซล ความเข้มข้น 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร
- กรรมวิธีที่ 4 สารละลายพาโคลบิวทราโซล ความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร
- กรรมวิธีที่ 5 แช่น้ำก่อนปลูก

นำหัวพันธุ์มาปลูกในถุงดำ ขนาด 6 x 8 นิ้ว ในดินผสม รดน้ำวันละ 1 ครั้ง ให้ปุ๋ยเม็ดสูตรเสมอ 15-15-15 อัตรา 1 กรัมต่อถุง เดือนละ 1 ครั้ง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 5 กรรมวิธี ๆ ละ 10 ซ้ำ (1 ต้นต่อซ้ำ)

บันทึกผลการทดลอง

- 1. จำนวนวันตั้งแต่ปลูกถึงยอดออกสูง 10 เซนติเมตร
- 2. เปอร์เซ็นต์การออก
- 3. ความสูงของต้น วัดจากโคนต้นถึงปลายยอดที่สูงที่สุด (ไม่รวบใบ)
- 4. จำนวนใบต่อต้น จำนวนหน่อต่อกอ
- 5. คุณภาพดอก (ความยาวก้านช่อ เส้นผ่าศูนย์กลางดอก จำนวนกลีบประดับ)

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลการราดสารพาโคลบิวทราโซลต่อการควบคุมการเจริญเติบโตของปทุมมาและกระเจียว

คัดเลือกหัวพันธุ์ปทุมมา จำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ เชียงใหม่พิงค์ และ ดอยตุงเรด ส่วนกระเจียว จำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ มณีสยาม และ บัวชั้น จากนั้นนำหัวพันธุ์ที่ได้ มาทำการทดลอง โดยปลูกหัวพันธุ์ในถุงพลาสติก ขนาด 6x8 นิ้ว ใช้ดินผสมเป็นวัสดุปลูก รดน้ำทุกวัน จนกระทั่งพืชออกประมาณ 10 เซนติเมตร จึงเริ่มให้พืชได้รับการวิธีทดลองดังนี้

- กรรมวิธีที่ 1 ราดสารพาโคลบิวทราโซลความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 1 ครั้ง
- กรรมวิธีที่ 2 ราดสารพาโคลบิวทราโซลความเข้มข้น 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 1 ครั้ง
- กรรมวิธีที่ 3 ราดสารพาโคลบิวทราโซลความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 1 ครั้ง
- กรรมวิธีที่ 4 ราดสารพาโคลบิวทราโซลความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 2 ครั้ง
- กรรมวิธีที่ 5 ราดสารพาโคลบิวทราโซลความเข้มข้น 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 2 ครั้ง
- กรรมวิธีที่ 6 ราดสารพาโคลบิวทราโซลความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 2 ครั้ง

กรรมวิธีที่ 7 ไม่ราดสาร (กรรมวิธีควบคุม)

กรรมวิธีที่ราดครั้งที่ 2 จะราดหลังจากครั้งแรก 2 สัปดาห์ ให้ปุ๋ยเม็ดสูตรเสมอ 15-15-15 อัตรา 1 กรัมต่อถุง เดือนละ 1 ครั้ง จัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียลในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) จำนวน $(3 \times 2) + 1$ กรรมวิธีๆ ละ 10 ซ้ำ (1 ต้นต่อซ้ำ) บันทึกผลเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 3 พัฒนารูปการขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณหัวพันธุ์ปทุมมาและกระเจียว

นำหัวพันธุ์ปทุมมา จำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ เชียงใหม่พิงค์ และ ดอยตุงเรด ส่วนกระเจียว จำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ โกลเด้นเรน และ กระเจียวส้ม มาศึกษาการเพิ่มปริมาณหัวพันธุ์ โดยศึกษาปัจจัย การผ่าหัวพันธุ์ก่อนปลูก ได้แก่

ปัจจัยที่ 1 ขนาดหัวเริ่มต้น ได้แก่ หัวขนาดเล็ก และ หัวขนาดใหญ่

ปัจจัยที่ 2 จำนวนชั้นที่ผ่าต่อหัว ได้แก่ 2 ชั้น และ 4 ชั้นต่อหัว

ปัจจัยที่ 3 ตำแหน่งการผ่าหัว ได้แก่ ผ่าตามยาว และ ผ่าตามขวาง

โดยทุกชั้นที่ผ่าจะต้องมีตาติดอยู่จำนวน 1 ตา นำชิ้นส่วนที่ผ่าได้มาทาด้วยสารเคมีกำจัดเชื้อรา ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำไปชำในทรายผสมถ่านกลบ อัตรา 1:1 ในตะกร้าพลาสติก รักษาความชื้นให้สม่ำเสมอ วางแผนการทดลองแบบ CRD แบ่งเป็นหัวขนาดเล็กกับหัวขนาดใหญ่ ศึกษาจำนวนชั้นในการผ่าและตำแหน่งในการผ่า รวมเป็นกลุ่มละ 5 กรรมวิธีๆ ละ 4 ซ้ำๆ ละ 4 หัว

บันทึกผลการทดลอง

1. น้ำหนักและขนาดหัวเริ่มต้น
2. น้ำหนักสดของชิ้นส่วนที่ผ่าตามกรรมวิธีต่างกัน
3. เปอร์เซ็นต์การงอก จำนวนวันตั้งแต่ชำถึงงอก
4. การเจริญเติบโต คุณภาพดอก และหัวพันธุ์

การทดลองที่ 4 ผลของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำร่วมกับน้ำยายีตอายุปักแจกันต่ออายุการใช้งานของปทุมมาและกระเจียว

ทำการเตรียมดอกปทุมมาและกระเจียว โดยตัดดอกตามระยะที่เหมาะสม จากนั้นนำดอกมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ตามปัจจัยดังต่อไปนี้

ปัจจัยที่ 1 อุณหภูมิสำหรับเก็บรักษาที่แตกต่างกัน 2 ระดับ ได้แก่

1. เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง
2. เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

ปัจจัยที่ 2 วิธีการเก็บรักษา 2 ระดับ

1. เก็บรักษาแบบแห้ง
2. เก็บรักษาแบบเปียก (แช่ก้านดอกในน้ำกลั่น)

ปัจจัยที่ 3 ระยะเวลาการเก็บรักษา 2 ระดับ

1. 3 วัน
2. 7 วัน

หลังการทดลองการเก็บรักษาน้ำช่อดอกปทุมมาฉีดพ่นด้วยน้ำยายีตอายุ คือ (GA₃+BA) ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารจับใบที่บริเวณช่อดอกปทุมมา ส่วนกระเจียวฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นผสมสารจับใบ จากนั้นผึ่งทิ้งไว้ให้แห้งก่อนนำไปปักในน้ำกลั่นและนำไปเก็บไว้ในสภาพอุณหภูมิห้อง บันทึกอายุการปักแจกัน จำนวนวันที่เริ่มแสดงอาการก้านลีบ จำนวนดอกจริงที่บ้าน การเปลี่ยนแปลงสีของ bract และ coma bract และลักษณะการเสื่อมสภาพอื่นๆ ที่ปรากฏ

จัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียลในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) จำนวน 2x2x2 กรรมวิธีๆ ละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ดอก = 240 ดอก

การทดลองที่ 5 การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพเชื้อปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคทางดินของปทุมมาและกระเจียว

1. ทำการเก็บเชื้อตัวอย่างทั้งเชื้อสาเหตุโรค และเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ในพื้นที่โครงการโดยทำการแยกเชื้อ และเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อศึกษาหาชนิดของเชื้อที่เกิดการแพร่ระบาดในพื้นที่

2. ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคทางดิน

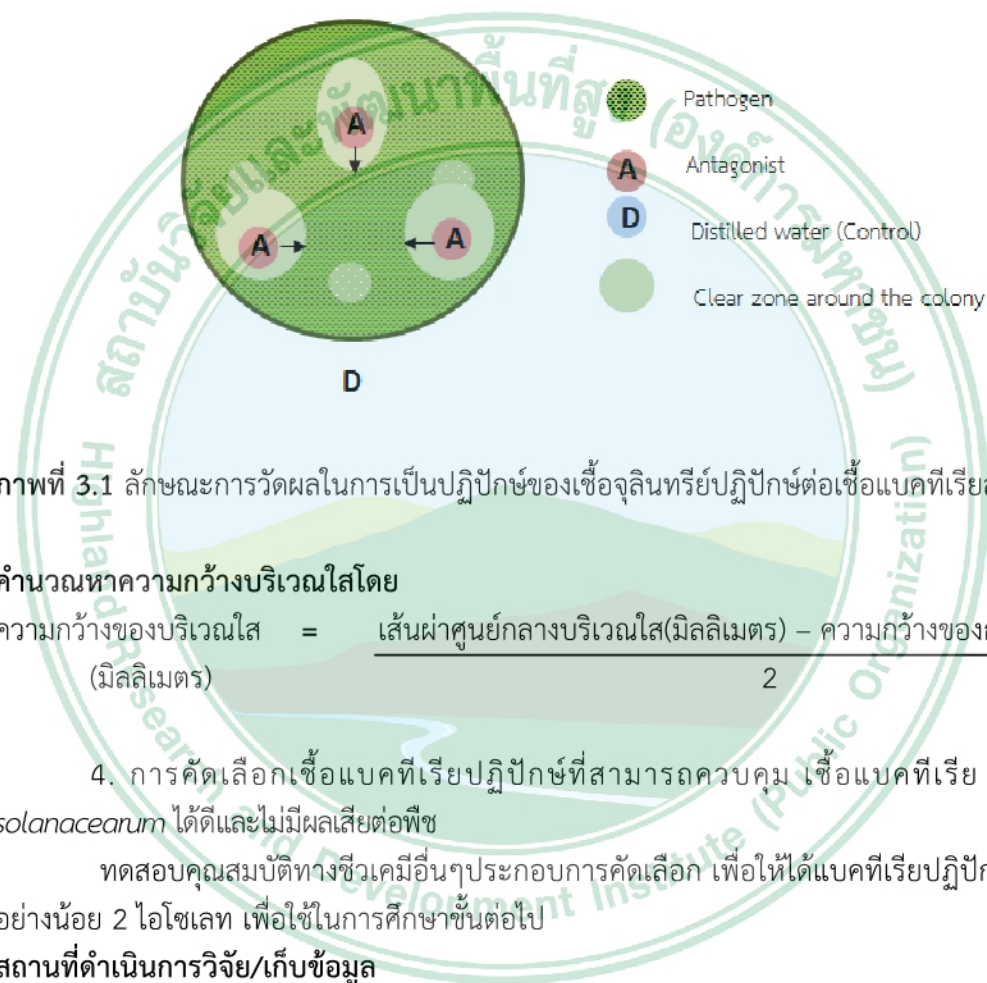
การแยกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากผิวน้ำและดินรอบๆ ราก นำตัวอย่างรากและดินรอบๆ รากมาแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้วยวิธี root wash technique (Chase et al., 1992) โดยนำรากพืชที่มีดินติดอยู่ ใส่ลงในหลอดแก้วที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ นำไปเขย่าเพื่อให้ผิวน้ำสัมผัสกับน้ำ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-1} - 10^{-3} เท่า ดูดสารแขวนลอย 0.1 มิลลิลิตร ไปหยดลงบนผิวหน้าอาหาร PDA แล้วทำการ spread plate บ่มเชื้อไว้ 24-72 ชั่วโมง รอจนกระทั่งมีเชื้อจุลินทรีย์เจริญออกมา หลังจากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อและย้ายเชื้อลงเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ และทำการเพิ่มปริมาณเชื้อเพื่อเก็บไว้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3. การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อการควบคุมโรคทางดิน (เชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*)

การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยวิธี paper disc method โดยย้ายโคโลนีของเชื้อสาเหตุ *Ralstonia solanacearum* อายุ 24-48 ชั่วโมง จำนวน 10 loops ใส่ลงในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อโดยมีปริมาตร ประมาณ 10 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ปรับค่าความขุ่นของเซลล์ (O.D.) ให้ได้ = 1.0 จากนั้นใช้สารแขวนลอยแบคทีเรียที่ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เทลงในอาหาร NA ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ที่หลอมไว้ให้มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ผสมเชื้อและอาหารให้เข้ากันดี แล้วจึงเททับบนอาหาร NA ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อและแข็งตัวแล้ว (basal layer) เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อส่วนที่เททับ basal layer แข็งตัวดีแล้ว จึงนำแผ่นกระดาษกรองที่มีแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลท เตรียมโดยการใช้กระดาษกรองฆ่าเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร แตะลงบนโคโลนีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เลี้ยงบนอาหาร NA อายุ 48 ชั่วโมง นำมาวางลงผิวน้ำอาหารโดยวาง 4 ตำแหน่งต่อหนึ่งจานเลี้ยงเชื้อ สำหรับชุดควบคุมใช้กระดาษกรองชุบน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ นำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจและบันทึกข้อมูลโดยการวัดบริเวณที่เกิดลักษณะวงใส แล้วนำค่าความกว้าง

บริเวณใสที่ได้มาคำนวณทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม Statistic 8.0 ตามวิธีการ Linear Models โดยการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomize design ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังนี้

ทำการบันทึกผล โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแผ่นกระดาษกรองรวมบริเวณใส (clear zone) ทั้งแนวตั้งและแนวนอนของการทดสอบ นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความกว้างบริเวณใส ดังภาพที่ 3.1



1. ศูนย์วิจัยและฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
4. สถานีเกษตรหลวงปางดะ อ.สะเมิง จ.เชียงใหม่