บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ในการทดลองครั้งนี้ใช้เมล็ด และต้นอ่อนของกล้วยไม้หวายแดงจันทบูร รวมทั้งอุปกรณ์สำหรับปฏิบัติงานในตู้กรองอากาศบริสุทธิ์ อุปกรณ์สำหรับเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมอาหารตามสูตร VW และสารเคมีที่ใช้เพิ่มเติมในแต่ละการทดลอง ดังต่อไปนี้

อุปกรณ์และสารเคมี

1. ฝักกล้วยไม้หวายแดงจันทบูรอายุ 6 เดือน เก็บจากโรงเรือนกล้วยไม้ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

2. ต้นอ่อนกล้วยไม้หวายแดงจันทบูรขนาด 0.5เซนติเมตร

3. อุปกรณ์สำหรับปฏิบัติงานในตู้กรองอากาศบริสุทธิ์(air flow cabinet) ปากคีบ (forceps) มีดผ่าตัดตะเกียงแอลกอฮอล์ จานแก้ว (petri dish) เป็นต้น

4. อุปกรณ์สำหรับเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง เช่น เครื่องชั่งชนิดทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง เครื่องวัด ความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) เครื่องคนสารแบบมีแม่เหล็ก (megnetic stirrer) บีกเกอร์ แท่งแก้วคนสาร และขวดทรงกลมสำหรับใส่อาหาร

5. สารเคมีสำหรับฆ่าเชื้อ เอทธานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์

6. สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมอาหารธาตุอาหารตามสูตรVW (ตารางผนวก 1) โพแทสเซียม-ไฮดรอกไซด์ (KOH) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล น้ำตาลแมนนิทอล (mannitol) น้ำตาลซูโครส (sucrose) น้ำกลั่น น้ำมะพร้าว มันฝรั่ง กล้วยหอมผง ถ่าน และผงวุ้น

วิธีการทดลอง

1.การทดลองที่ 1ผลของน้ำมะพร้าวต่อการงอกเมล็ดหวายแดงจันทบูร

1.1 วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยมีสูตรอาหารสังเคราะห์ Vacin and Went (1949) หรือ VW ที่แตกต่างกัน 5 สิ่งทดลอง ๆ ละ 10 ซ้ำ มีรายละเอียดดังนี้

สิ่งทดลองที่ 1 อาหารสูตร VWไม่เติมน้ำมะพร้าว

สิ่งทดลองที่ 2อาหารสูตร VWที่เติมน้ำมะพร้าว 100 มิลลิลิตรต่อลิตร

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

สิ่งทดลองที่ 3อาหารสูตร VWที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร

สิ่งทดลองที่ 4อาหารสูตร VWที่เติมน้ำมะพร้าว 200 มิลลิลิตรต่อลิตร

สิ่งทดลองที่ 5 อาหารสูตร VWที่เติมน้ำมะพร้าว 250 มิลลิลิตรต่อลิตร

1.2 วิธีการทดลอง

1.2.1 เตรียมอาหารเพาะเมล็ดกล้วยไม้สูตร VW ที่แตกต่างกันประกอบไปด้วยสูตรต่าง ๆ ดังนี้ อาหารสังเคราะห์สูตร VW ไม่เติมน้ำมะพร้าว, อาหารสังเคราะห์สูตร VW ร่วมกับการเติมน้ำมะพร้าว 100 มิลลิลิตรต่อลิตร, อาหารสังเคราะห์สูตร VW ร่วมกับการเติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร, อาหารสังเคราะห์สูตร VW ร่วมกับการเติมน้ำมะพร้าว 200 มิลลิลิตรต่อลิตร และอาหารสังเคราะห์สูตร VW ร่วมกับการเติมน้ำมะพร้าว 250 มิลลิลิตรต่อลิตร

1.2.2 นำเมล็ดจากฝักกล้วยไม้หวายแดงจันทบูรมาเลี้ยงในอาหารที่ทำการเตรียมไว้

1.2.3 หลังจากนั้นนำมาเลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ 16 ชั่วโมงต่อวัน

1.2.4 สังเกตและทำการบันทึกผลการทดลอง

1.3 การบันทึกข้อมูล

ทำการเก็บผลการทดลองดังต่อไปนี้

1.3.1 จำนวนวันที่ใช้ในการงอก : นับจำนวนวันเริ่มตั้งแต่ที่เริ่มเพาะเมล็ดจนกระทั่งเมล็ดงอกเป็นโปรโตคอร์ม

1.3.2 เปอร์เซ็นต์ความงอก : เก็บข้อมูลเปอร์เซ็นต์ที่เมล็ดกล้วยไม้หวายแดงจันทบูร

2. การทดลองที่ 2ผลของสารอินทรีย์ที่มีผลต่อการเกิดโปรโตคอร์มของเมล็ดหวายแดงจันทบูร

2.1 วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยมีสูตรอาหารสังเคราะห์ Vacin and Went (1949) ที่แตกต่างกัน 5 สิ่งทดลอง ๆ ละ 10 ซ้ำ มีรายละเอียดดังนี้

สิ่งทดลองที่ 1อาหารสูตร VW

สิ่งทดลองที่ 2อาหารสูตร VWที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร

สิ่งทดลองที่ 3อาหารสูตร VWที่เติมมันฝรั่งบด 100 กรัมต่อลิตร

สิ่งทดลองที่ 4อาหารสูตร VWที่เติมน้ำมะพร้าว 100 มิลลิลิตรต่อลิตร + มันฝรั่งบด 50 กรัมต่อลิตร

สิ่งทดลองที่ 5 อาหารสูตร VWที่เติมน้ำมะพร้าว 50 มิลลิลิตรต่อลิตร + มันฝรั่งบด 50 กรัมต่อลิตร + กล้วยหอมบด 50 กรัมต่อลิตร

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏราไพพรรณี

1.2 วิธีการทดลอง

1.2.1 เตรียมอาหารเพาะเมล็ดกล้วยไม้สูตร Vacin and Went (1949) ที่เติมสารอินทรีย์แตกต่างกันประกอบไปด้วยสูตรต่าง ๆ ดังนี้ อาหารสังเคราะห์สูตร VW ร่วมกับการเติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร, อาหารสังเคราะห์สูตร VW ร่วมกับการเติมมันฝรั่งบด 100 กรัมต่อลิตร, อาหารสังเคราะห์สูตร VW ร่วมกับการเติม น้ำมะพร้าว 100 มิลลิลิตรต่อลิตร + มันฝรั่งบด 50 กรัมต่อลิตร และอาหารสังเคราะห์สูตร VW ร่วมกับการเติมน้ำมะพร้าว 50 มิลลิลิตรต่อลิตร + มันฝรั่งบด 50 กรัมต่อลิตร และกล้วยหอมบด 50 กรัมต่อลิตร

1.2.2 นำเมล็ดจากฝักกล้วยไม้หวายแดงจันทบูรมาเลี้ยงในอาหารที่ทำการเตรียมไว้

1.2.3 หลังจากนั้นนำมาเลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ 16 ชั่วโมงต่อวัน

1.2.4 สังเกตและทำการบันทึกผลการทดลอง

1.3 การบันทึกข้อมูล

ทำการเก็บผลการทดลองดังต่อไปนี้

1.3.1จำนวนวันที่ใช้ในการงอก : นับจำนวนวันเริ่ม ตั้งแต่ที่เริ่มเพาะเมล็ดจนกระทั่งเมล็ดงอกเป็นโปรโตคอร์ม

1.3.2เปอร์เซ็นต์ความงอก : เก็บข้อมูลเปอร์เซ็นต์ที่เมล็ดกล้วยไม้หวายแดงจันทบูร

3.การทดลองที่ 3ผลของน้ำตาลแมนนิทอลต่อการลดการเจริญเติบโตของหวายแดงจันทบูร

2.1 วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) มีระดับความเข้มข้นของน้ำตาลที่แตกต่างกัน 7 ระดับ เป็นสิ่งทดลอง มีทั้งหมด 7 สิ่งทดลอง ๆ ละ 10 ซ้ำ ๆ ละ 4 ต้นมีรายละเอียดดังนี้

สิ่งทดลองที่ 1 Modified Vacin and Went (1949) ไม่เติมน้ำตาล

สิ่งทดลองที่ 2 Modified Vacin and Went (1949) เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์

สิ่งทดลองที่ 3 Modified Vacin and Went (1949) เติมน้ำตาลแมนนิทอล 2 เปอร์เซ็นต์

สิ่งทดลองที่ 4 Modified Vacin and Went (1949) เติมน้ำตาลแมนนิทอล 4 เปอร์เซ็นต์

สิ่งทดลองที่ 5 Modified Vacin and Went (1949) เติมน้ำตาลแมนนิทอล 6 เปอร์เซ็นต์

สิ่งทดลองที่ 6 Modified Vacin and Went (1949) เติมน้ำตาลแมนนิทอล 8 เปอร์เซ็นต์

สิ่งทดลองที่ 7 Modified Vacin and Went (1949) เติมน้ำตาลแมนนิทอล 10 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 คัดเลือกต้นอ่อนของกล้วยไม้หวายแดงจันทบูรให้มีขนาด0.5 เซนติเมตร

2.2.2 เตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร Modified Vacin and Went (1949)ที่มีความแตกต่างของระดับความเข้มข้นของน้ำตาลแมนนิทอล 6 ระดับ คือ 0, 2, 4, 6, 8, และ 10 เปอร์เซ็นต์ และอาหารสังเคราะห์สูตร Modified Vacin and Went (1949)ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์

2.2.3. จากนั้นย้ายต้นอ่อนลงอาหารที่เตรียมไว้ และนำไปเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25±1องศาเซลเซียสภายใต้สภาพแสงฟลูออเรสเซนต์ 16 ชั่วโมงต่อวัน

2.2.4. สังเกตและบันทึกผลการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้หวายแดงจันทบูร

2.3 การบันทึกข้อมูล

เก็บบันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้หวายแดงจันทบูร ทุก ๆ 2 สัปดาห์ โดยเก็บบันทึกข้อมูลดังนี้

2.3.1ความสูงของต้นกล้วยไม้หวายแดงจันทบูร : โดยวัดจากผิววุ้นจนถึงปลายยอด

2.3.2 เส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วย : วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่กว้างที่สุดของลำ

4. การทดลองที่ 4ผลของน้ำตาลซูโครสต่อการลดการเจริญเติบโตของหวายแดงจันทบูร

3.1วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) มีระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่แตกต่างกัน 6 ระดับ เป็นสิ่งทดลอง มีทั้งหมด 6 สิ่งทดลอง ๆ ละ 10 ซ้ำ ๆ ละ 4 ต้นมีรายละเอียดดังนี้

สิ่งทดลองที่ 1 Modified Vacin and Went (1949) ไม่เติมน้ำตาล

สิ่งทดลองที่ 2 Modified Vacin and Went (1949) เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์

สิ่งทดลองที่ 3 Modified Vacin and Went (1949) เติมน้ำตาลซูโครส4 เปอร์เซ็นต์

สิ่งทดลองที่ 4 Modified Vacin and Went (1949) เติมน้ำตาลซูโครส6 เปอร์เซ็นต์

สิ่งทดลองที่ 5 Modified Vacin and Went (1949) เติมน้ำตาลซูโครส8 เปอร์เซ็นต์

สิ่งทดลองที่ 6 Modified Vacin and Went (1949) เติมน้ำตาลซูโครส10 เปอร์เซ็นต์

3.2 วิธีการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.2.1 คัดเลือกต้นอ่อนของกล้วยไม้หวายแดงจันทบูรให้มีขนาด0.5 เซนติเมตร

3.2.2 เตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร Modified Vacin and Went (1949)ที่มีความแตกต่างของระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 6 คือ 0, 2, 4, 6, 8, และ 10 เปอร์เซ็นต์

3.2.3 จากนั้นย้ายต้นอ่อนลงอาหารที่เตรียมไว้ และนำไปเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25±1 องศาเซลเซียสภายใต้สภาพแสงฟลูออเรสเซนต์ 16 ชั่วโมงต่อวัน

3.2.4 สังเกตและบันทึกผลการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้หวายแดงจันทบูร

3.3 การบันทึกข้อมูล

เก็บบันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้หวายแดงจันทบูร ทุก ๆ 1 เดือน โดยเก็บบันทึกข้อมูลดังนี้

3.3.1ความสูงของต้นกล้วยไม้หวายแดงจันทบูร : โดยวัดจากผิววุ้นจนถึงปลายยอด

3.3.2 เส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วย : วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่กว้างที่สุดของลำ

5. การทดลองที่ 5อัตราการมีชีวิตรอดภายหลังการย้ายปลูก

ศึกษาอัตรารอดชีวิตของกล้วยไม้หวายแดงจันทบูรภายหลังการย้ายปลูกในช่วงเดือนเมษายน โดยทำการย้ายออกปลูกที่โรงเรือนคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรจันทบุรีและโรงเรือนกล้วยไม้สำนักวิจัยและพัฒนาองค์การสวนพฤกษศาสตร์ เพื่อติดตามการเจริญเติบโตภายหลังการเก็บรักษาพันธุกรรมด้วยการชะลอการเจริญเติบโต

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการเก็บบันทึกข้อมูล วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s Multiple Range Test (DMRT)

7. สถานที่ทำการวิจัย

อาคารปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จังหวัดจันทบุรี

8. ระยะเวลาการทำการวิจัย

มีนาคม2558ถึง กุมภาพันธ์2559รวมระยะเวลา12เดือน

สถาบันวิทยบริการ มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี