

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์ที่ใช้ศึกษาภาคสนาม

- 1.1 แผนที่อุทยานแห่งชาติน้ำตกชาติตระการ มาตรฐาน 1: 50,000
- 1.2 เครื่องมือชี้พิกัดจากดาวเทียมหรือ GPS (Global Positional System)
- 1.3 กล้องถ่ายภาพดิจิทัล
- 1.4 ไม้บรรทัด
- 1.5 เทปวัดระยะทาง

2. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

- 2.1 เมล็ดของฝักกล้วยไม้เอื้องคำกิว (*Dendrobium signatum* Rchb.f.)
- 2.2 อาหารพื้นฐานสูตร Vacin and Went (1949)
- 2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโต ออกซิน (Auxin) และไซโทไคนิน (Cytokinin)
- 2.4 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้เตรียมอาหาร ได้แก่
 - 2.4.1 ช้อนตักสารเคมี (spatula)
 - 2.4.2 เครื่องชั่ง (balance) ทั้งแบบหยาบและแบบละเอียด
 - 2.4.3 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)
 - 2.4.4 เตาอบความร้อน (hot air oven)
 - 2.4.5 หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
 - 2.4.6 เตาอบไมโครเวฟ (microwave oven)
 - 2.4.7 เตาอุ่นความร้อนและเครื่องคน (hot plate and magnetic stirrer)
 - 2.4.8 เครื่องแก้ว เช่น หลอดทดลอง (test tube) beaker ขวด (flask)

ปิเปต (pipet) กรวยแก้ว (funnel) ขวดอาหารและแท่งแก้วคนขนาดและรูปร่างต่าง ๆ

2.5 อุปกรณ์และเครื่องมือในการย้ายเนื้อเยื่อที่สำคัญ ได้แก่

- 2.5.1 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (laminar air – flow)
- 2.5.2 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 2.5.3 กระจาดรอง subculture ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

2.5.4 จานแก้วหรือสแตนเลสที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว

2.5.5 มีดผ่าตัดแบบต่าง ๆ

2.5.6 ปากคีบ (forceps) ขนาดและแบบต่าง ๆ

2.5.7 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) พร้อมหลอดทดลองที่อบหรือหนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

2.5.8 อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น เข็มเย็บ (needle)

3. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่สำคัญ คือ

3.1 ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ (culture room)

3.2 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (temperature controller)

3.3 ชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อ และติดตั้งหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์

3.4 เครื่องควบคุมเวลา (timer)

4. อุปกรณ์ในการนำต้นอ่อนกล้วยไม้ออกปลูก

4.1 ต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องคำกิว (*Dendrobium signatum* Rchb.f.)

4.2 โรงเรือนและราวแขวนลูกกล้วยไม้

4.3 ภาชนะปลูก ได้แก่ ตะกร้าพลาสติก และกระถางขนาด 1 นิ้ว

4.4 เครื่องปลูก ได้แก่ ลูกอัดกาบมะพร้าว และขอสมนดา

4.5 สารเคมีที่ใช้บำรุงและป้องกันต้นอ่อนกล้วยไม้จากโรคและแมลง ได้แก่ ปุ๋ย

สารกำจัดแมลง และสารกำจัดเชื้อรา

วิธีการทดลอง แบ่งเป็นดังนี้

การทดลองที่ 1 การสำรวจกล้วยไม้เอื้องคำกิว (*Dendrobium signatum* Rchb.f.)

สำรวจกล้วยไม้เอื้องคำกิว (*Dendrobium signatum* Rchb.f.) ในพื้นที่เขตอุทยานแห่งชาติน้ำตกชาติตระการ จังหวัดพิษณุโลก โดยศึกษาการกระจายพันธุ์ด้วยเครื่องมือที่พิกัดจากดาวเทียม GPS (Global Positioning System) เพื่อชี้พิกัดและการกระจายพันธุ์โดยการศึกษาเป็นแนวเส้นทาง (Transect Method) ด้วยการเดินตามเส้นทางศึกษาธรรมชาติเป็นระยะทางประมาณ 3 กิโลเมตร ทุกระยะ 50 เมตร และมีแนวการสำรวจบริเวณรอบเส้นทางศึกษาธรรมชาติทั้ง 2 ข้าง ซ้ายและขวา เป็นระยะทางข้างละประมาณ 20 เมตร เพื่อเป็นตัวแทนของกล้วยไม้เอื้องคำกิวที่พบในอุทยานแห่งชาติน้ำตกชาติตระการ จังหวัดพิษณุโลก

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องคำก๊ว

นำเมล็ดกล้วยไม้เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารดัดแปลง Vacin and Went (1949) ที่เติมน้ำมะพร้าวปริมาณ 100 มิลลิลิตร น้ำตาล 20 กรัม และวุ้น 8 กรัม เป็นเวลา 2 เดือน

นำต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องคำก๊วที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้ออายุ 2 เดือนมาเลี้ยงบนสูตรอาหารดัดแปลงสูตร VW (1949) ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร กล้วยหอมบด 100 กรัมต่อลิตร น้ำตาลทราย 10 กรัมต่อลิตร วุ้น 8 กรัมต่อลิตร และผงถ่าน 2 กรัมต่อลิตร (กนกวรรณ, 2541; ภูมิรินทร์, 2544; ศิริลักษณ์, 2544) ที่เติม NAA 0, 0.5, 1, 1.5, 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0, 0.5, 1, 1.5, 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.1-5.2 เก็บไว้ในห้องเพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ได้รับแสงเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน วางแผนการทดลองแบบ 5×5 factorial in CRD (completely randomized design) มี 25 สิ่งทดลอง สิ่งทดลองละ 20 ซ้ำ โดยเพาะเลี้ยงต้นอ่อนลงในขวดละ 1 ต้น โดยบันทึกผลการทดลองทุก ๆ 1 เดือน เป็นระยะเวลา 4 เดือน โดยนับจำนวนต้นตอกออเจเลีย นับจำนวนใบเฉลี่ย วัดความสูงต้นเฉลี่ย นับจำนวนรากเฉลี่ย วัดความยาวรากเฉลี่ย

การทดลองที่ 3 การศึกษาวัสดุปลูกที่เหมาะสมในการปลูกกล้วยไม้เอื้องคำก๊ว

นำต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องคำก๊ว อายุ 6 เดือนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารดัดแปลงสูตร VW ที่เป็นสูตรพื้นฐานทำให้มีขนาดและมีความสูงเท่ากันประมาณ 1 เซนติเมตร มาปรับสภาพโดยนำขวดอาหารไปวางไว้ในสภาพอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นนำมาล้างวัสดุปลูกที่ติดอยู่กับรากและลำต้นให้สะอาดออกให้หมด ผึ่งให้หมาดก่อนนำไปปลูกในกระถาง 1 นิ้ว ย้ายปลูกในสภาพโรงเรือนมีอุณหภูมิเฉลี่ย 35-40 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 70-90 เปอร์เซ็นต์ พรางแสง 50 เปอร์เซ็นต์ รดน้ำวันละ 1 ครั้ง (เช้า) ให้ปุ๋ยอาทิตย์ละ 1 ครั้ง โดยปลูกในวัสดุปลูกดังนี้ สิ่งทดลองที่ 1 เปลือกมะพร้าวสับ สิ่งทดลองที่ 2 มอส สิ่งทดลองที่ 3 หินภูเขาไฟ สิ่งทดลองที่ 4 ถ่านไม้ สิ่งทดลองที่ 5 เปลือกสน วางแผนการทดลองแบบ CRD (completely randomized design) มี 5 สิ่งทดลอง สิ่งทดลองละ 20 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ต้น บันทึกอัตราการรอดชีวิตหลังจากปลูกเป็นเวลา 2 เดือน

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ด้วยวิธี DMRT (Duncan's Multiple Range Test)

สถานที่ทำการทดลอง

เรือนเพาะชำและห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ (เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ) ภาควิชา
วิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัย
นเรศวร

ระยะเวลาการทดลอง

การสำรวจและการทดลองเริ่มตั้งแต่เดือนมีนาคม 2548 ถึงเดือนมิถุนายน 2550

