

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัสดุ-อุปกรณ์

- กระดาษทิชชู
- ถังพลาสติก
- ขางรีด
- กระบอกฉีดน้ำ
- กระบอกตวง ขนาด 10 มล.
- กระบอกตวง ขนาด 250 มล.
- กระบอกตวง ขนาด 500 มล.
- ขวดเพาะเลี้ยง 8 ออนซ์ พร้อมฝา
- เข็มฉีดยา
- จานอาหารเพาะเชื้อ (petri dish)
- ช้อนตักสาร
- ค้อนมีดผ่าตัด เบอร์ 3
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- ตะแกรงโลหะ
- แท่งแก้วคนสาร
- ปีกเกอร์ ขนาด 50 มล.
- ปีกเกอร์ ขนาด 250 มล.
- ปีกเกอร์ ขนาด 500 มล.
- ปีกเกอร์ ขนาด 1,000 มล.
- ปีกเกอร์พลาสติกมีหูจับ 500 มล.
- ใบมีดผ่าตัด เบอร์ 11

- ปากคืบ
- ปิเปต ขนาด 1 มล.
- ปิเปต ขนาด 5 มล.
- ปิเปต ขนาด 10 มล.
- ลูกยางแดงสำหรับดูดปิเปต
- เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
- เตามะเหลืกไฟฟ้า
- ตู้เขียเชื้อ
- หมอืนึ่งควมค่นไอ

3.1.2 สารเคมี

- กลัวยหอม
- น้ำมะพร้าว
- มันฝรั่ง
- มะละกอ
- มะเขือเทศ
- ผงถ่าน
- ผงวุ้น
- ทวีน 20
- เอทานอล 95%
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- ไฮโดรคลอริก (HCl)
- โพแตสเซียมไนเตรด (KNO_3)
- โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
- แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)
- แมงกานีสซัลเฟต ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

- แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- โซเดียม อีดีทีเอ ($\text{Na}_2 \text{EDTA}$)
- ซิงค์ซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- ไตร-แคลเซียมฟอสเฟต ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การศึกษาสูตรอาหารสังเคราะห์ Vacin and Went และ Vacin and Went ดัดแปลงที่เหมาะสมในการเพาะเมล็ดกล้วยไม้สกุลแวนด้าสายพันธุ์ป่า

(1) การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- 1) การเตรียมสารละลายเข้มข้นของสูตรอาหาร Vacin and Went ได้แก่ Vacin and Went
- 2) อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร Vacin and Went
 1. ผสมธาตุอาหารกลุ่มที่ 1, ธาตุอาหารกลุ่มที่ 2, ธาตุอาหารกลุ่ม Fe-EDTA และเติมสารไตรแคลเซียมฟอสเฟต 0.2 กรัม ที่ละลายด้วยกรดเกลือ 1 นอร์มอล
 2. เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน
 3. เติมน้ำตาลกลูโคส 20 กรัม
 4. นำมาปรับระดับความเป็นกรด-ด่าง ให้เป็น 5.0
 5. เติมน้ำยาลดออกซิเจน 0.6 กรัม คนให้เข้ากัน
 6. ทำการต้มวุ้น 7 กรัม ในน้ำประมาณ 250 มิลลิลิตร คนเบาๆ ตลอดเวลาจนวุ้นละลาย นำวุ้นที่ต้มแล้วเทลงในสารอาหารที่เตรียมไว้ ปรับปริมาณให้เป็น 1000 มิลลิลิตร
 7. เทอาหารลงในบีกเกอร์ที่มีนุ้บ ทำการกรอกอาหารลงขวดเพาะเลี้ยง ปิดฝา
 8. นำอาหารเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน ที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
 9. นำขวดอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่นึ่งฆ่าเชื้อ และเย็นแล้วเก็บไว้ในตู้ที่สะอาด
- 3) อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร Vacin and Went ดัดแปลง
 1. ผสมธาตุอาหารตามอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร Vacin and Went (ข้อ 3.2.1.1) โดยเพิ่มสารอินทรีย์จากธรรมชาติ และปรับความเป็น pH เท่ากับ 5.0 ได้แก่

- สูตร Vacin and Went (VW) ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร น้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร รุน 7 กรัมต่อลิตร

- สูตร Vacin and Went ดัดแปลง สูตรที่ (MV₁) ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร น้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร รุน 7 กรัมต่อลิตร กล้วยหอมสุก 100 กรัม ผสมกับมันฝรั่งต้มสุก 50 กรัม

- สูตร Vacin and Went ดัดแปลง สูตรที่ (MV₂) ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร น้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร รุน 7 กรัมต่อลิตร กล้วยหอมสุก 100 กรัม บดผสมกับมะละกอสุก 50 กรัม

- สูตร Vacin and Went ดัดแปลง สูตรที่ (MV₃) ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร น้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร รุน 7 กรัมต่อลิตร กล้วยหอมสุก 100 กรัม บดผสมกับมะเขือเทศสุก 100 กรัม

- สูตร Vacin and Went ดัดแปลง สูตรที่ (MV₄) ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร น้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร รุน 7 กรัมต่อลิตร มันฝรั่งต้มสุก 50 กรัม บดผสมกับมะละกอสุก 50 กรัม

- สูตร Vacin and Went ดัดแปลง สูตรที่ (MV₅) ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร น้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร รุน 7 กรัมต่อลิตร มันฝรั่งต้มสุก 50 กรัม บดผสมกับมะเขือเทศสุก 100 กรัม

- สูตร Vacin and Went ดัดแปลง สูตรที่ (MV₆) ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร น้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร รุน 7 กรัมต่อลิตร มะละกอสุก 50 กรัม บดผสมกับมะเขือเทศสุก 100 กรัม

(2) การเพาะเมล็ด

1. นำฝักกล้วยไม้มาล้างให้สะอาดด้วยสบู่ และล้างน้ำให้สะอาด
2. ตัดแต่งโดยเกล้านฝักให้เรียบ รุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ วางบนจานเพาะเชื้อ
3. นำเชื้อจานเพาะเชื้อโดยการฉีดพ่นด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นำเข้าตู้ย่ายเนื้อเชื้อ

4. ทำการจัดอุปกรณ์ในการตัดเนื้อเชื้อในตู้ย่ายเนื้อเชื้อตามความถนัด อุปกรณ์ที่ใช้ในตู้ย่ายเนื้อเชื้อจะต้องผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

5. ทำการฆ่าเชื้ออุปกรณ์ในการตัดเนื้อเยื่อ คือ มีด และคีมคีบ โดยจุ่มในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ลนไฟ แล้วทิ้งไว้ให้เย็น

6. ทำการฟอกฆ่าเชื้อผักกล้วยไม้ โดยแช่ผักกล้วยไม้ลงในคลอโรกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ ที่หยด Tween-20 1-2 หยด แช่เป็นเวลา 15-20 นาที

7. ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 5 นาที เพื่อล้างคลอโรกซ์ออก

8. ย้ายผักลงบนจานเพาะเชื้อ ใช้มีดตัดผ่าผักกล้วยไม้ ออก ทำการถ่ายเมล็ดลงในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารสูตร Vacin and Went และสูตร Vacin and Went คัดแปลงทั้ง 6 สูตร

9. นำขวดเพาะเลี้ยง ไปเก็บไว้ในที่มืด จนกระทั่งเมล็ดงอกจึงย้ายมาเลี้ยงไว้ในที่มีแสงสว่าง

10. บันทึกการเปลี่ยนแปลง ระยะเวลาการงอกหลังจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดทุก 1 สัปดาห์ จนกระทั่งต้นอ่อนเจริญเห็นใบ หรือรากชัดเจน โดยมีความสูงประมาณ 0.5-1.0 เซนติเมตร และถ่ายภาพ

3.2.2 การศึกษาสูตรอาหารสังเคราะห์ Vacin and Went และ Vacin and Went คัดแปลงที่เหมาะสมในการเจริญของต้นกล้วยไม้สกุลแวนด้าสายพันธุ์ป่า

1. ใช้คีมคีบย้ายต้นกล้วยไม้ที่เจริญเห็นใบชัดเจนประมาณ 2-3 ใบ ความสูงประมาณ 0.5-1.0 เซนติเมตร ลงในอาหารสูตร Vacin and Went และสูตร Vacin and Went คัดแปลงทั้ง 6 สูตร เพื่อชักนำให้เกิดต้นและรากต่อไป โดยหิมรากของต้นกล้วยไม้ ให้จมในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพอประมาณ

2. ลนไฟปากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออีกครั้ง

3. เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส โดยให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน

4. บันทึกการเจริญเติบโตโดยวัดความสูง จำนวนใบ จำนวนราก ความยาวของใบ ความยาวของราก และน้ำหนักสดทุก 30, 60, 90 และ 120 วัน โดยทำการสุ่มตัวอย่างต้นกล้วยไม้ในขวดเพาะเลี้ยงจากอาหารแต่ละสูตร นำมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และถ่ายภาพ

3.2.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

1. นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ โดยใช้วิธีหาค่าเฉลี่ย (Mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation) คำนวณจากสูตรดังนี้

ค่าเฉลี่ย (Mean)

คำนวณได้จากสูตร

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{N}$$

เมื่อ \bar{x} = ค่าเฉลี่ยของการเจริญเติบโตของกล้วยไม้

$\sum x_i$ = ผลรวมของการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ในอาหารแต่ละสูตร

N = จำนวนกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด

เบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation)

คำนวณได้จากสูตร

$$S.D = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

เมื่อ $S.D$ = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

N = จำนวนกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด

$\sum x_i$ = ผลรวมของการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ในอาหารแต่ละสูตร

\bar{x} = ค่าเฉลี่ยของการเจริญเติบโตของกล้วยไม้

2. วิเคราะห์ความแตกต่างของสูตรอาหารทั้ง 7 ชนิด โดยใช้ One-way ANOVA ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์