

บทที่ 3

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

อุปกรณ์ภาคสนาม

1. กล้องถ่ายรูป
2. เครื่องคอมพิวเตอร์ Lap top
3. พาหนะเดินทาง
4. เทปวัด
5. สมุดสำหรับบันทึกข้อมูล

3.2 อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ

1. ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ
2. หม้อนึ่งอัดความดันไอน้ำ
3. เครื่องซังดิจิตอล
4. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
5. บีกเกอร์ ความจุ 1,000 มิลลิลิตร
6. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ
7. มีดผ่าตัด
8. ปากคีบ
9. กระจกพิวมัน
10. แท่งแก้วคนสารเคมี
11. ตะเกียงแอลกอฮอล์
12. แอลกอฮอล์ 70% และ 90%
13. กรดไนตริก ความเข้มข้น 10%
14. โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์
15. น้ำยาล้างจาน
16. ขวดแก้วสำหรับเพาะเมล็ดกล้วยไม้ ขนาด 4 และ 8 ออนซ์
17. หม้อแสตนเลสสำหรับต้มอาหาร
18. เต้าแก๊ส
19. เครื่องสับ ปั่น ผสมอาหาร
20. อาหารเพาะเมล็ด และเพาะเลี้ยงต้นกล้วยไม้สูตร Vacin & Went ดัดแปลง (1949) ครึ่งสูตร

21. พืชทดลอง ได้แก่ กล้วยไม้สกุลลั่นมั่งกร ฝักกล้วยไม้อายุ 7 สัปดาห์

3.3 อุปกรณ์ในการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ในเรือนโรง

1. ต้นกล้วยไม้สกุลลั่นมั่งกร

2. วัสดุปลูก ได้แก่ ขุยมะพร้าว สแฟกนัมมอส ปุ๋ยหมักไบจามจรี ปุ๋ยเคมีละลายช้า กระจกปลูกกล้วยไม้

3.4 กระบวนการและวิธีการดำเนินงาน

1) การศึกษาภาคสนาม

(1) กำหนดพื้นที่ศึกษา ได้แก่ จุดที่ 1 น้ำตกตาดขาม ในวนอุทยานน้ำตกตาดขาม โดยกำหนดแปลงสำรวจทางด้านขวาของน้ำตกชั้นที่ 2 ขนาดพื้นที่ 5 X 10 เมตร จุดที่ 2 น้ำตกตาดโพธิ์ ชั้นที่ 3 กำหนดแปลงสำรวจด้านหน้าแอ่งน้ำตก ขนาดพื้นที่ 10 X 20 เมตร จุดที่ 3 ทางเดินศึกษาธรรมชาติ ในอุทยานแห่งชาติภูแล้งคา อำเภอบ้านแพง จังหวัดนครพนม ระยะทางเดิน 1 กิโลเมตร ทางเดินกว้างประมาณ 2 เมตร ระยะสำรวจ 2 ข้างทางเดินข้างละ 3 เมตร และจุดที่ 4 จุดผ่อนปรนการค้าชายแดนไทย-ลาว อำเภอท่าอุเทน จังหวัดนครพนม

(2) สำรวจชนิดกล้วยไม้สกุลลั่นมั่งกร และบันทึกภาพ นับจำนวนประชากรกล้วยไม้แต่ละชนิดที่สำรวจพบในพื้นที่ศึกษา ตั้งแต่เดือนมิถุนายน ถึง เดือนตุลาคม 2559 รวมทั้งหมด 8 ครั้ง

(3) ศึกษาวิเคราะห์สภาพแหล่งอาศัย

(4) ปลูกเลี้ยงต้นในเรือนโรง โดยมีต้นพันธุ์อยู่แล้ว และได้รวบรวมมาจากจุดผ่อนปรนการค้าชายแดนไทย-ลาว อำเภอท่าอุเทน ซึ่งเป็นพื้นที่ศึกษาเพื่อศึกษาวงรอบการเจริญเติบโต และการเพิ่มขึ้นของจำนวนหัวหรือลำต้นใต้ดิน ในเรือนโรงที่กันฝน และพรางแสงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยปลูกในกระถางดินเผาสำหรับปลูกกล้วยไม้ ขนาด 4 นิ้ว ตะกร้าพลาสติกทรงกลมขนาด 4 นิ้ว และกระถางพลาสติกขนาด 4 นิ้ว เพื่อสังเกตความสามารถในการระบายน้ำ เนื่องจากช่วงการเจริญเติบโตของกล้วยไม้อยู่ในช่วงฤดูฝนที่มีปริมาณการตกชุกมาก การระบายน้ำในภาชนะปลูกจึงมีความสำคัญ รวมไปถึงเครื่องปลูกต้องมีความโปร่ง เครื่องปลูกที่ใช้ ได้แก่ ขุยมะพร้าว สแฟกนัมมอส ปุ๋ยหมักไบจามจรี ผสมกัน อัตรา 1: 1: 1 ให้ปุ๋ยเคมีละลายช้า ออสโมโคส สูตร 12 - 25 - 6 ประมาณ 2 กรัมต่อกระถาง

(5) ดูแลรักษา ให้น้ำในวันที่ไม่มีฝนตก หรือ สัปดาห์ละ 1 ครั้ง กำจัดศัตรู เช่น แมลง โรค และวัชพืชในกระถางปลูก สังเกตการเจริญเติบโตตลอดตั้งแต่ต้นกล้วยไม้เริ่มแทงหน่อ ไปจนถึงลำต้นบนดินเหี่ยวแห้งตาย และลำต้นใต้ดินหรือหัวเข้าสู่ระยะพักตัว

(6) ฝึกอบรม การขยายพันธุ์กล้วยไม้ด้วยวิธีการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ

2) การศึกษาในห้องปฏิบัติการ

การขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลลิ้นมังกรด้วยการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำฝักของพืชทดลองที่ปลูกเลี้ยงในเรือนโรง และเป็นชนิดที่สำรวจพบในพื้นที่ศึกษา มาทำการเพาะ มีขั้นตอนในการดำเนินการดังนี้

- (1) เตรียมฝักกล้วยไม้สกุลลิ้นมังกรที่ปลูกเลี้ยงในเรือนโรงที่เป็นพืชทดลอง ชนิดสีเหลืองทั้งดอก ชนิดกลีบเลี้ยงและกลีบดอกสีเขียวกลีบปากสีแดง ชนิดสีแดงทั้งดอก และนางอ้วกแก้วชำ อายุฝัก 6-7 สัปดาห์ เลือกฝักจากโคนช่อดอกที่มีขนาดใหญ่ เพื่อนำมาเพาะเมล็ดในห้องปฏิบัติการที่ปลอดเชื้อ
- (2) เตรียมอาหารวิทยาศาสตร์สำหรับเพาะเมล็ด ได้แก่อาหารสูตรVacin & Went ดัดแปลง(1949) ครั้งสูตร ด้วยการเติมกล้วยหอมบด ปริมาณ 25 กรัม และน้ำมะพร้าว ปริมาณ 75 มิลลิลิตร ต่ออาหาร 1 ลิตร

ส่วนประกอบของอาหารเพาะเมล็ดสูตร Vacin & Went ดัดแปลง (1949) ครั้งสูตร และวิธีการเตรียม

- | | | |
|-----------------------------------|--------|-----------|
| 1. Tricalcium phosphate | 0.10 | กรัม |
| 2. Potassium nitrate | 0.263 | กรัม |
| 3. Ammonium sulfate | 0.125 | กรัม |
| 4. Monopotassium acid phosphate | 0.125 | กรัม |
| 5. Magnesium sulfate | 0.25 | กรัม |
| 6. Manganese sulfate | 0.0038 | กรัม |
| 7. Ferrous sulfate | 0.0125 | กรัม |
| 8. น้ำตาลทราย | 10 | กรัม |
| 9. น้ำมะพร้าวอ่อน | 75 | มิลลิลิตร |
| 10. น้ำสะอาด | 600 | มิลลิลิตร |
| 11. กล้วยหอม 25 กรัม บดในน้ำสะอาด | 100 | มิลลิลิตร |
| 12. ผงวุ้น | 5 | กรัม |
13. ผสมส่วนประกอบทุกอย่างในน้ำสะอาด คนให้ละลายเข้ากัน ปรับ ค่า พี. เอช. ให้ได้ 5.2 ด้วยกรดไนตริก หรือ โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์
 14. นำอาหารไปตั้งไฟอ่อนๆ เติมผงวุ้นแล้วคนให้ละลาย
 15. เติมผงถ่านกัมมันต์ 2 กรัม คนอย่าให้ตกตะกอน
 16. กรอกใส่ขวดเพาะ ปิดฝาขวดให้แน่น นำไปนึ่งในหม้อนึ่งอัดความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 เซลเซียส ความดัน 15 – 20 ปอนด์ ต่อ ตารางนิ้ว นาน 20 นาที
 17. เมื่อครบเวลา และความดันหม้อนึ่งลดลงถึง 0 (ศูนย์) เปิดฝามือ เอาขวดอาหารออกมา ปิดฝาขวดให้แน่น วางไว้ในที่เย็น รอการใช้ต่อไป

ขั้นตอนการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ

เมล็ดกล้วยไม้ที่นำมาเพาะต้องมาจากฝักที่มีอายุ 6-7 สัปดาห์ ซึ่งถือว่าเหมาะสมที่สุดทำให้เมล็ดงอกได้เร็วที่สุด โดยมีวิธีการดังนี้

1. เตรียมอาหารที่จะใช้สำหรับการเพาะเมล็ด
2. เตรียมฝักกล้วยไม้ที่จะเพาะ โดยฝักต้องมีอายุครบ ฝักสมบูรณ์ พร้อมนำมาเพาะได้ ล้างฝักด้วยให้สะอาดด้วยน้ำยาล้างจาน และสบู่เหลวเพื่อฆ่าเชื้อโรคที่ผิวฝัก
3. เตรียมตู้ปลอดเชื้อ นำฝักกล้วยไม้ที่จะเพาะ และอุปกรณ์ได้แก่ ขวดอาหาร ปากคีบ มีดผ่าตัด ขวดแอลกอฮอล์ สำลีก้อน ตะเกียงแอลกอฮอล์ จานเพาะเลี้ยงเชื้อ ขวดน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วผสมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 10 % หลอดดูด เข้าในตู้ปลอดเชื้อ เปิดไฟ UVC นาน 15-20 นาที เพื่อฆ่าเชื้อโรคภายในตู้ รวมถึงอุปกรณ์ต่างๆด้วย
4. ผู้ที่จะเพาะ เตรียมตัวให้สะอาด ปลอดเชื้อโรค ด้วยการล้างมือ และแขนพอกด้วยสบู่เหลว เช็ดซ้ำด้วยแอลกอฮอล์ 70%
5. การเพาะ นำมีดผ่าตัด ปากคีบ หรือช้อนตักเมล็ด จุ่มในขวดแอลกอฮอล์ 90% แล้วเผาไฟให้ลุกท่วมเพื่อฆ่าเชื้อโรค วางรอไว้บนตะแกรงให้เย็น
6. นำฝักกล้วยไม้ที่จะเพาะ จุ่มในขวดแอลกอฮอล์ 90% เผาไฟฆ่าเชื้อโรคอีกครั้ง วางรอไว้บนจานเพาะเลี้ยงเชื้อให้เย็น แล้วจึงใช้มีดผ่าตัด ฝักเอาเมล็ดออกมา ใช้ปลายมีดผ่าตัดเขี่ยเมล็ดลงในขวดไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 10 % ปิดฝาขวดเขย่าเพื่อฟอกฆ่าเชื้อที่ติดมากับฝักหรือเมล็ด โดยพอกนาน 10 นาที
7. เปิดขวดอาหาร ลนไฟที่ปากขวดฆ่าเชื้อโรค วางรอไว้ให้เย็น ใช้หลอดดูด ดูดเมล็ดในขวดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วพ่นใส่ลงในขวดอาหาร พยายามให้กระจายทั่วหน้าจูน ลนไฟที่ปากขวดอีกครั้ง รอให้เย็นจึงปิดฝา
8. วางขวดเพาะไว้ในกล่องที่มีมิด ห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส รอผลการงอกต่อไป ถ้าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อโรคในขวดเพาะเลี้ยง หลังจากเพาะเมล็ดแล้วประมาณ 3 เดือน เมล็ดจะเริ่มงอกและพัฒนาโปรโตคอร์ม จึงจะทำการถ่ายขวดเพาะเลี้ยงให้โปรโตคอร์มเจริญเป็นต้นกล้าต่อไป

การศึกษาข้อมูลการเพิ่มจำนวนหัวหรือลำต้นใต้ดิน

กล้วยไม้สกุลลิ้นมังกร มีหัวสะสมอาหารอยู่ใต้ดิน(tuber) โดยที่ 1 หัว จะมี 1 ตา ซึ่งจะให้กำเนิดลำต้นบนดิน 1 ต้น เมื่อครบวงจรการเจริญเติบโตแล้ว ต้นที่สมบูรณ์สามารถสร้างหัวจาก 1 เป็นจำนวนที่เพิ่มขึ้นได้ ดังนั้นหลังจากที่กล้วยไม้พักตัวแล้วสามารถขุดหัวขึ้นมานับได้ กล้วยไม้ที่ปลูกเลี้ยงเพื่อศึกษาการเพิ่มจำนวนหัว ได้คัดเลือกชนิดที่มีหัวแบบหัวเดี่ยว คือ ดอกสีเขียวกลิบบากสีชมพู ดอกสีเขียวกลิบบากสีแดง ดอกสีแดง และนางอ้วกแก้วข้า ชนิดละ 5 ต้น รวม 20 ต้นเพื่อเป็นตัวอย่างการเก็บข้อมูล

3.3 การเก็บข้อมูล

1. เก็บข้อมูลจำนวนชนิด และประชากรของกล้วยไม้สกุลลิ้นมังกร ที่สำรวจพบในพื้นที่ศึกษาทั้ง 4 จุด ได้แก่ ได้แก่ จุดที่ 1 น้ำตกตาดขาม ในวนอุทยานน้ำตกตาดขาม จุดที่ 2 น้ำตกตาดโพธิ์ ชั้นที่ 3 จุดที่ 3 เส้นทางเดินธรรมชาติ ในอุทยานแห่งชาติภูลังกา อำเภอบ้านแพง จังหวัดนครพนม ระยะทางเดิน 1 กิโลเมตร และจุดที่ 4 จุดผ่อนปรนการค้าชายแดนไทย-ลาว อำเภอท่าอุเทน จังหวัดนครพนม
2. ศึกษาวงรอบการเจริญเติบโต
3. ผลการงอกของเมล็ดที่เพาะในสภาพปลอดเชื้อ และจำนวนหัวที่ต้นสร้างเพิ่มขึ้นใน 1 รอบการเจริญเติบโต