

บทที่ 3
วิธีการทดลอง

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์

1. แผลงอัดพรรณไม้
2. คู่มือตัวอย่างพืช
3. สายวัดความยาว
4. ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 8
ออนซ์
5. มีดผ่าตัด
6. หม้อ
7. ถูมือกันความร้อน
8. กระจกบอกตวงขนาด 100
มล., 50 มล., 10 มล.
9. แท่งแก้วคนสาร
10. แวนชขาย
11. หม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ
12. บีกเกอร์
13. ขวดรูปชมพู่
14. เต้าแก๊ส
15. กระจกวางปลูกต้นไม้
16. ดินทราย
17. กระจกยทชช
18. pH มิเตอร์
19. เทอร์โมมิเตอร์
20. เครื่องวัดแสง
21. Microscope; stereo photo. Set รุ่น
Nikon sm2-2t Type 21
22. ตู้แยกเชื้อ
23. ตะเกียงแอลกอฮอล์
24. ปากกิบ
25. ชั้นวาง
26. ถูพลาสติกและยางวง
27. กระจกยหนังสือพิมพ์
28. สมุดบันทึกและดินสอดำ
29. ชุดอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
30. กรรไกรตัดกิ่ง
31. กล้องจุลทรรศน์
32. บั้วรดน้ำ
33. กระจก
34. กระจก

2. สารเคมี

- | | |
|--|---|
| 1. แอลกอฮอล์ 70 % , 95% | 11. โซเดียม โมลิบเดต
($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) |
| 2. แอมโมเนียมไนเตรด (NH_4NO_3) | 12. โคบอลต์คลอไรด์ ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) |
| 3. โพแทสเซียมไนเตรด (KNO_3) | 13. คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) |
| 4. แคลเซียมคลอไรด์
($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) | 14. เฟอรัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) |
| 5. แมกนีเซียมซัลเฟต
($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) | 15. โซเดียมเอทิลีน ไดอามีน เตตราอะซีเตต ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$) |
| 6. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจน
ฟอสเฟต (KH_2PO_4) | 16. ซูโครส (Sucrose) |
| 7. กรดบอริก (H_3BO_3) | 17. ผงวุ้น (Agar) |
| 8. แมงกานีสซัลเฟต
($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) | 18. คลอโรกซ์ (Clorox) 10 % |
| 9. ซิงค์ซัลเฟต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) | 19. ทวิน-20 |
| 10. โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) | 20. 0.5-1 N NaOH |
| | 21. 0.5-1 N HCl |

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ศึกษองค์ประกอบทางกายภาพ

สำรวจพื้นที่ภูเขาหินปูนในจังหวัดนครสวรรค์ ได้แก่ วนอุทยานเขาหลวง เขาหน่อ เขาหน้าผา และวนอุทยานถ้ำเพชร-ถ้ำทอง เป็นต้น พร้อมวาดแผนที่บอกอาณาเขต และทำการศึกษาปัจจัยทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิดิน อุณหภูมิอากาศ ความชื้น ความเป็นกรด-ด่าง ความเข้มแสง และปริมาณน้ำฝน

1.1 อุณหภูมิดิน

ศึกษาอุณหภูมิดินโดยทำการขุดดินลึก 10 เซนติเมตร วัดอุณหภูมิดินโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์เสียบลงไปดิน อ่านผลตามขีดสีแดงของปรอทที่เคลื่อนที่จนหยุดนิ่ง โดยทำการวัดเวลาประมาณ 12.00 น. วัดพื้นที่ละ 3 จุด พร้อมทั้งจดบันทึก

1.2 อุณหภูมิอากาศ

ศึกษาอุณหภูมิอากาศโดยใช้เชือกผูกปลายเทอร์โมมิเตอร์แขวนไว้แล้วอ่านผลตามขีดสีแดงของปรอทที่เคลื่อนที่จนหยุดนิ่ง โดยทำการวัดเวลาประมาณ 12.00 น. วัดพื้นที่ละ 3 จุด พร้อมทั้งจดบันทึก

1.3 ความชื้นในดิน

ศึกษาความชื้นในดินโดยการขุดดินลึกประมาณ 10 ซม. เก็บใส่ถุงพลาสติกแล้วใช้ยางรัดปากถุงให้แน่นโดยเก็บเวลาประมาณ 12.00 น. ทำการเก็บพื้นที่ละ 3 จุด แล้วนำมาห้องปฏิบัติการเพื่อชั่งตัวอย่างละ 5 กรัม จดบันทึกน้ำหนักก่อนเข้าอบ จากนั้นนำไปอบโดยเครื่องอบไอร้อนที่ 60 °C นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำไปชั่งน้ำหนักอีกครั้ง จดบันทึกแล้วคำนวณโดยใช้สูตร

$$\text{ระดับความชื้น (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักดินก่อนอบ} - \text{น้ำหนักดินหลังอบ}}{\text{น้ำหนักดินหลังอบ}} \times 100$$

1.4 ความเป็นกรด-ด่าง

ศึกษาความเป็นกรด-ด่างโดยการขุดดินลึกประมาณ 10 ซม. เก็บใส่ถุงพลาสติกแล้วใช้ยางรัดปากถุงให้แน่นโดยเก็บเวลาประมาณ 12.00 น. ทำการเก็บพื้นที่ละ 3 จุด แล้วนำมาห้องปฏิบัติการเพื่อทำการวัดความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้ช้อนตักสารตักดินมา 3 ช้อน ละลายในน้ำกลั่นร่อนน้ำกลั่นใสจากนั้นใช้ pH มิเตอร์ จุ่มลงไป อ่านผลแล้วทำการจดบันทึก

1.5 ความเข้มแสง

ศึกษาความเข้มแสงทำการวัดแสงในที่แสงรำไรและที่แจ้งโดยใช้ Lux meter วัดแสงโดยสังเกตในสถานที่ที่มีแสงน้อยควรวัดที่ช่วง 1 เท่า (×1) ในสถานที่ที่มีแสงสว่างไม่มากควรวัดที่ช่วง 10 เท่า (×10) และในสถานที่ที่มีแสงสว่างมากควรวัดที่ช่วง 100 เท่า (×100) นำเซนเซอร์รับแสงไปวางไว้บริเวณที่ต้องการวัดความเข้มแสงโดยวัดความเข้มแสงเวลาประมาณ 12.00 น. ทำการวัดพื้นที่ละ 3 จุด แล้วอ่านผล ทำการจดบันทึก แล้วนำค่าที่ได้ไปคูณด้วยช่วงที่ทำการวัด เช่น วัดที่ช่วง 10 เท่า คูณค่าที่อ่านได้ด้วย 10 ผลที่ได้จะมีหน่วยเป็นลักซ์ ถ้าบนจอแสดงผลมีเลข 1 เพียงเลขเดียวเลื่อนช่วงการวัดไปในช่วงที่สูงขึ้นหรือถ้าอ่านที่ได้มีค่าน้อยมาก จึงเลื่อนสวิตซ์ลงมาในช่วงการวัดที่ต่ำลง

2. ศึกษาสำรวจความหลากหลายของแอฟริกันไวโอเล็ตในจังหวัดนครสวรรค์

กำหนดพื้นที่ในการสำรวจภาคสนามโดยเก็บตัวอย่างพืชวงศ์เจสเนอร์ิเอซีอี จากภูเขาหินปูนในจังหวัดนครสวรรค์ ได้แก่ วนอุทยานเขาหลวง เขาหน่อ เขาน้ำผา และวนอุทยานถ้ำเพชรถ้ำทอง เป็นต้น บันทึกข้อมูล พร้อมถ่ายภาพประกอบ

3. ศึกษาและจัดจำแนกชนิดของแอฟริกันไวโอเล็ตที่พบ

3.1 เก็บตัวอย่างแอฟริกันไวโอเล็ตชนิดละ 3 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างทั้งลำต้นและราก บันทึกลักษณะต่าง ๆ แล้วนำมาอบแห้ง

3.2 เก็บดอกของแอฟริกันไวโอเล็ตแต่ละชนิดนำมาดองด้วยแอลกอฮอล์ 70 % เพื่อดูการเรียงตัวของกลีบดอก ลักษณะเกสรตัวผู้ ตัวเมีย รังไข่ และรูปร่างของดอก

3.3 เก็บฝักแก่ของแอฟริกันไวโอเล็ตแต่ละชนิดมาศึกษาลักษณะรูปร่างของฝัก และนำมาฝังลมให้แห้ง จากนั้นนำฝักมากรีดเอาเมล็ดออกมาใส่ขวดที่มีฝาปิดเพื่อนำไปเพาะเมล็ดต่อไป

4. ตัวอย่างอนุกรมวิธาน

The following simplified key to the sections applies only to the Thai species.

1. Rosette plants: flowers with very short tube and ? flat limb; fruit short, swollen on upper side near base sect. **Loxocarpus**
1. Caulescent plants sect. **Didymanthus**
 2. Leaves opposite
 2. Leaves alternate
3. Internodes well developed; nectary tongue-like placed below the ovary and often 3-toothed at the tip sect. **Glossadenia**
3. Internodes vary short, leaves usually crowded at top of woody stem; nectary copular surrounding the base of the ovary sect. **Heterobocea**

(Thawatchai, 2001)

5. ศึกษาการขยายพันธุ์

5.1 ขยายพันธุ์โดยการปักชำใบ

5.1.1 เลือกใบที่เจริญเติบโตเต็มที่ แต่ไม่แก่หรืออ่อนจนเกินไป จากนั้นหักก้านใบให้หลุดออกจากลำต้น

5.1.2 ใช้มีดโกนคมๆ ตัดก้านใบดำจากแผ่นใบลงมาให้ยาว 3-4 ซม. และตัดปลายใบโดยห่างจากโคนใบ 2 นิ้ว จากนั้นทำการจุ่มก้านใบของแอฟริกันไวโอเล็ตแต่ละชนิดลงใน IBA ที่ละลายในแอลกอฮอล์ 10% ที่ความเข้มข้น 0, 25 และ 50 มิลลิกรัม/ลิตร (ดูวิธีเตรียมจากภาคผนวก ก ข้อ 1.) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.1.3 นำก้านใบไปปักเอนๆ ลงในดินทราย โดยปักชำใบ 1 ตัวอย่าง ต่อ 1 กระถาง โดยมีน้ำหล่ออยู่ก้นกระถาง ทำการเปรียบเทียบตัวอย่างละ 5 ชำ นำไปไว้ในที่ร่มเป็นระยะเวลา 30 วัน จากนั้นทำการหาร้อยละ (%) การเกิดราก วัดความยาวรากเฉลี่ย ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (LSD)

5.2 ขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ด

5.2.1 เก็บฝักของแอฟริกันไวโอเล็ตทั้ง 4 ชนิดมาโดยดูว่าสีของฝักมีสีเหลืองแสดงว่าฝักแก่แล้ว ฝักฝักให้แห้งจากนั้นแกะเมล็ดออกมา

5.2.2 ตีตาราง 100 ช่อง วางบนกระดาษทิชชูขนาดใหญ่ซ้อนกัน 2 แผ่น

5.2.3 สุ่มฝักแต่ละชนิดที่จะทำการทดสอบมาจำนวน 5 ฝัก โดยดูขนาดที่ใกล้เคียงกัน จากนั้นทำการแกะเมล็ดออกมา เมล็ดพันธุ์ที่ได้แช่น้ำเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แช่น้ำอุ่นประมาณ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และแช่กรดอ่อน HCl 0.1 M (ดูวิธีเตรียมจากภาคผนวก ก ข้อ 4.) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

5.2.4 สุ่มตัวอย่างละ 20 เมล็ด นำมาวางเรียงบนตารางที่แบ่งไว้โดยวางแบบสุ่ม ใช้กระดาษทิชชูอีกแผ่นวางทับบนตัวอย่าง ฉีดน้ำให้ชุ่มทั่วทั้งแผ่นกระดาษทิชชู แล้วม้วนกระดาษ

5.2.5 นำไปวางไว้ที่ลมไม่โกรกและไม่มีแดด และฉีดน้ำให้ความชื้นทุกเช้า-เย็น ทำการเปรียบเทียบตัวอย่างละ 5 ชำ เป็นเวลา 60 วัน จากนั้นนับจำนวนเมล็ดวัดความยาวของราก และทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (LSD) การหาร้อยละ (%) การงอก และหาระยะเวลาของการงอกของเมล็ดแอฟริกันไวโอเล็ตแต่ละชนิด โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{จำนวนวันโดยเฉลี่ย} = \frac{N_1T_1 + N_2T_2 + \dots + N_xT_x}{\text{จำนวนต้นทั้งหมดที่งอก}}$$

N คือ จำนวนเมล็ดที่งอกในแต่ละวัน

N_1 คือ จำนวนเมล็ดที่งอกครั้งแรก

N_x คือ จำนวนเมล็ดที่งอกสุดท้าย

T คือ เวลาจากเริ่มทดลองจนถึงแต่ละวันที่นับเมล็ดงอก

หาสัมประสิทธิ์ความเร็วในการงอกโดยคำนวณจากสูตร

$$\text{สัมประสิทธิ์ความเร็วในการงอก} = \frac{\text{จำนวนต้นทั้งหมดที่งอก} \times 100}{N_1T_1 + N_2T_2 + \dots + N_xT_x}$$

(<http://www.library.cmu.ac.th>, 26/10/2551)

5.3 ขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเมล็ดในอาหารปลอดเชื้อ (MS)

5.3.1 เตรียมอาหารแข็งสูตร MS โดยเตรียมอาหารแข็ง MS เต็มสูตร (คู่มือเตรียมจากภาคผนวก ก ข้อ 5.) $\frac{1}{2}$ MS $\frac{1}{2}$ MS เต็ม thidiazuron (TDZ) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.25 และ 1 มิลลิกรัม/ลิตร (คู่มือเตรียมจากภาคผนวก ก ข้อ 2.) และ $\frac{1}{2}$ MS เต็มน้ำมะพร้าวที่ระดับความเข้มข้น 0%, 10% และ 15% (คู่มือเตรียมจากภาคผนวก ก ข้อ 3.) โดยเติมฮอร์โมน น้ำตาลทราย 30 กรัม/ลิตร ปรับ pH 5.7-5.8 ใส่ผงวุ้น 8 กรัม/ลิตร นำไปต้มจนเดือด เทใส่ขวด 8 ออนซ์ ปิดฝาไม่ ต้องแน่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

5.3.2 เตรียมตู้ถ่ายเนื้อเยื่อโดยเช็ดทำความสะอาดข้างในตู้ด้วยแอลกอฮอล์ 70% เตรียม อุปกรณ์ทำการทดลองที่ฆ่าเชื้อแล้วใส่ไว้ในตู้ แล้วเปิดแสง UV ฆ่าเชื้อประมาณ 15 นาที

5.3.3 นำฝักแอฟริกันไวโอเล็ตทั้ง 4 ชนิดมาฟอกด้วยน้ำยาล้างจาน 2-3 ครั้ง แล้วล้าง ด้วยน้ำกรอง จากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอโรกซ์ (Clorox) 10% ที่เติม ทวิน-20 2-3 หยด เขย่าเป็นระยะๆ ประมาณ 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้งๆ ละประมาณ 3 นาที แล้ว ล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70% ประมาณ 3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้งๆ ละประมาณ 3 นาที จากนั้นนำไปจุ่มแอลกอฮอล์ 95% แล้วนำฝักแอฟริกันไวโอเล็ตไปเผาไฟ พันธุ์สีม่วงดอกช่อ ต้องนำเมล็ดมาล้างแอลกอฮอล์ 70% แล้วเทใส่กระดาษกรอง จากนั้นเทน้ำกลั่นฆ่าเชื้อล้าง 3 ครั้ง ใช้ ห่วงเขี่ยเชื้อขูดเอาเมล็ดใส่ในจานแก้วที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

5.3.4 นำฝักของแอฟริกันไวโอเล็ตแต่ละชนิดมาวางบนจานเพาะเชื้อที่มีกระดาษฆ่าเชื้อ กรีดฝักแล้วนำเมล็ดออกมาโดยใช้ปากคีบใส่ในจานแก้วที่มีน้ำกลั่นฆ่า จากนั้นใช้หลอดหยดดูดเมล็ดแอฟริกันไวโอเล็ตแต่ละชนิด ใส่อาหารแข็ง MS แบบต่างๆ ปิดฝาขวดให้แน่น บันทึกชนิดแอฟริกันไวโอเล็ต สูตรอาหาร วันเดือนปี และชื่อผู้ทำการทดลองคิดไว้ข้างขวด ทำการเปรียบเทียบตัวอย่างละ 10 ซ้ำ

5.3.5 นำไปวางบนชั้นเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมไม่ให้มีแสงสว่าง ควบคุมอุณหภูมิที่ $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ เป็นระยะเวลา 60 วัน จากนั้นนับจำนวนเมล็ดที่งอก และสุ่มเมล็ดที่งอกมาขวดละ 3 เมล็ด นับจำนวนราก วัดความยาวของราก และทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (LSD) หาร้อยละ (%) การงอก และหาระยะเวลาของการงอกของเมล็ดแอฟริกันไวโอเล็ตแต่ละชนิด โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{จำนวนวันโดยเฉลี่ย} = \frac{N_1T_1 + N_2T_2 + \dots + N_xT_x}{\text{จำนวนต้นทั้งหมดที่งอก}}$$

N คือ จำนวนเมล็ดที่งอกในแต่ละวัน

N_1 คือ จำนวนเมล็ดที่งอกครั้งแรก

N_x คือ จำนวนเมล็ดที่งอกสุดท้าย

T คือ เวลาจากเริ่มทดลองจนถึงแต่ละวันที่นับเมล็ดงอก

หาสัมประสิทธิ์ความเร็วในการงอกโดยคำนวณจากสูตร

$$\text{สัมประสิทธิ์ความเร็วในการงอก} = \frac{\text{จำนวนต้นทั้งหมดที่งอก}}{N_1T_1 + N_2T_2 + \dots + N_xT_x} \times 100$$

(<http://www.library.cmu.ac.th>, 26/10/2551)