บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการ

1. การศึกษาการเจริญเติบโตของหม้อข้าวหม้อแกงลิง (*N. mirabilis*)

1.1 การเปลี่ยนแปลงทางด้านกายภาพและการเจริญเติบโตของหม้อข้าวหม้อแกงลิงในรอบ 1 ปี

วัดความสูงต้นพืชทุก 1 เดือนโดยใช้ตลับเมตรที่มีสายวัดทำด้วยพลาสติกเนื่องจากลำต้นพืชมีลักษณะโค้งงอ และวัดขนาดกระเปาะโดยใช้เวอร์เนียวัดความกว้างของกระเปาะบริเวณตรงกลางกระเปาะ และวัดความยาวของกระเปาะตั้งแต่ขอบปากกระเปาะลงไปถึงก้นกระเปาะ ทำการบันทึกความเข้มแสงทุก 1 เดือน โดยใช้เครื่อง Lux meter ผลิตโดยบริษัท Takemura Electric Works LTD รุ่น DM - 28 ส่วนอุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์ ได้รวบรวมข้อมูลจากสถานีวิจัยการเกษตรเขตชลประทาน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

1.1.1 การเตรียมพืชทดลอง

ใช้หม้อข้าวหม้อแกงลิง (*N. mirabilis*) ที่นำมาจาก บ. บุ่งแมลงใต้ ต.บุ่งแมลง กิ่ง อ. สว่างวีระวงศ์ จ. อุบลราชธานี (ภาพที่ 4 ก) จำนวน 16 ต้น ปลูกเพื่อพักฟื้นในตระกร้าพลาสติกขนาด 12 x 10 x 3 นิ้ว วัสดุปลูกที่ใช้ตลอดการวิจัยประกอบด้วยแกลบดิบ ขุยมะพร้าว และทราย อัตราส่วน 6 : 3 : 1 เพิ่มธาตุอาหารด้วยปุ๋ยน้ำสูตร CMU – RPF (อดิศร, 2544) (ภาคผนวก ก) เดือนละ 2 ครั้ง เลี้ยงในโรงเรือนที่มีความเข้มแสงประมาณ 4,000 ลักซ์ (ภาพที่ 4 ข) เป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นย้ายไปเลี้ยงในโรงเรือนที่มีการติดตั้งตาข่ายพรางแสง 50 % ความเข้มแสงภายในโรงเรือนเฉลี่ย 100,000 ลักซ์ (ภาพที่ 4 ค)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ก.

ข.

ค.

ภาพที่ 4 ขั้นตอนการเตรียมพืชทดลอง

ก. ภูมิประเทศที่เป็นถิ่นกำเนิดของหม้อข้าวหม้อแกงลิงจาก บ.บุ่งแมลงใต้ ต.บุ่งแมลงกิ่ง อ. สว่างวีระวงค์ จ. อุบลราชธานี

ข. โรงเรือนที่พักพื้นต้นไม้มีความเข้มแสงประมาณ 4,000 ลักซ์

ค. โรงเรือนทดลองที่มีความเข้มแสงประมาณ 100,000 ลักซ์

1.2. ผลของความยาววัน และความชื้นสัมพัทธ์ต่อการสร้างกระเปาะ

1.2.1 การเตรียมพืชทดลอง

คัดเลือกต้นที่กระเปาะไม่สามารถพัฒนาได้ (กระเปาะฝ่อ) และต้นที่กระเปาะสามารถพัฒนาได้ตามปกติจากพืชทดลองที่เตรียมไว้ตามข้อ 1.1.1 ซึ่งปลูกเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน

1.2.2 ขั้นตอนการศึกษา

นำต้นพืชทดลองมาเลี้ยงในห้องทดลองที่จัดให้มีแสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสงเฉลี่ย 1,300 ลักซ์ และปรับให้มีอุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน จากนั้นนำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ออกมาเลี้ยงในสภาพโรงเรือนเดิม โดยนำเฉพาะต้นที่กระเปาะไม่สามารถพัฒนาได้มาเลี้ยงในถุงพลาสติกใสขนาด 30 x 50 นิ้ว มัดปากถุงหลวมๆ เป็นเวลา 4 เดือน (ภาพที่ 5)

ภาพที่ 5 การปลูกเลี้ยงหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่กระเปาะไม่สามารถพัฒนาได้ในถุงพลาสติกใส

2. การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของกระเปาะ และเมล็ด

ทำการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของโครงสร้างภายในกระเปาะลักษณะต่างๆ และโครงสร้างของเมล็ด โดยใช้วิธี Paraffin embedding technique ของ Johansen (1940) (ภาคผนวก ข)

3. การศึกษาทางเซลล์วิทยาของหม้อข้าวหม้อแกงลิง

ทำการตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากปลายรากของหม้อข้าวหม้อแกงลิง (*N. mirabilis*) โดยใช้เทคนิค Feulgen 's squash method ปรับปรุงโดย อดิศร (2539) และ Dyer (1979) (ภาคผนวก ค) ซึ่งปลายรากได้จากการปักชำกิ่งในกระบะพลาสติกโดยใช้ถ่านแกลบเป็นวัสดุชำ รดน้ำให้พอชื้น นำไปเลี้ยงในถุงพลาสติกใสที่มัดปากถุงหลวมๆ ไว้จนกระทั่งกิ่งชำออกราก

4. การขยายพันธุ์หม้อข้าวหม้อแกงลิง (*N. thorelii*)

4.1 ผลของการฟอกฆ่าเชื้อต่อความมีชีวิตของเมล็ด

นำเมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิง (*N. thorelii*) ที่เก็บมาจาก จ.อุบลราชธานี และเก็บรักษาไว้ภายใต้อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มาทำการฟอกฆ่าเชื้อโดยการจุ่มเมล็ดในเอธิลแอลกอฮอล์ 70 % เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ แล้วนำไปแช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ 15 % นาน 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปทดสอบความมีชีวิตโดยแกะเปลือกหุ้มเมล็ดออก ผ่าเมล็ดเป็น 2 ส่วนตามยาว แล้วย้อมด้วยสารละลาย FDA ที่เตรียมไว้ (ภาคผนวก ง) ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที แล้วนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนต์เปรียบเทียบกับเมล็ดที่ไม่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2 การขยายพันธุ์โดยผ่านทางเมล็ด

4.2.1 การเพาะเมล็ดในสภาพโรงเรือน

4.2.1.1 ศึกษาการทำ Scarification ที่เหมาะสมต่อการเพาะเมล็ดในสภาพโรงเรือน

วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยการทำ Scarification 3 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 กรรมวิธีควบคุม แช่เมล็ดในน้ำ นาน 20 นาที (ภาพที่ 6 ก)

กรรมวิธีที่ 2 ฟอกเมล็ดด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 70 % และคลอร็อกซ์ 15 % (ภาพที่ 6 ข)

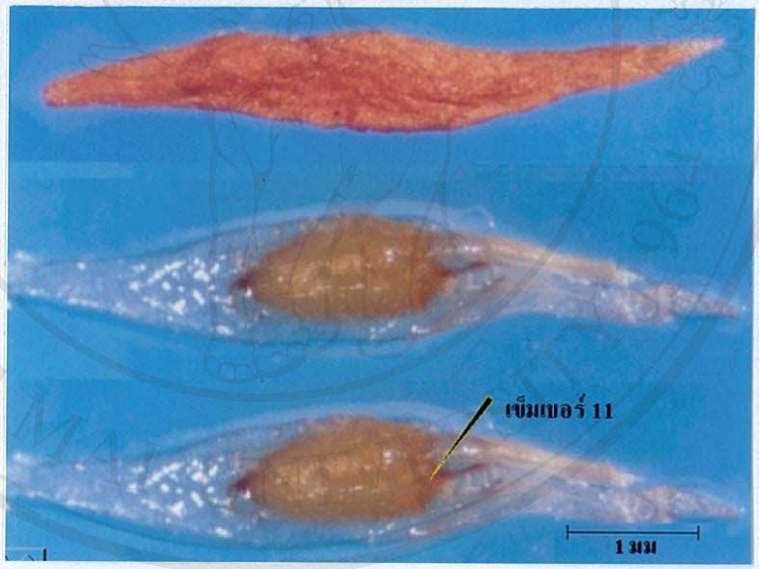
กรรมวิธีที่ 3 ฟอกเมล็ดด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 70 % และคลอร็อกซ์ 15 % แล้วใช้เข็มขนาดเล็กเจาะปลายเมล็ด (ภาพที่ 6 ค)

จากนั้นนำเมล็ดในแต่ละกรรมวิธีมาเพาะในทรายและขุยมะพร้าวร่อนละเอียดอัตรา 1 : 1 ที่อบฆ่าเชื้อด้วยไมโครเวฟ (ภาคผนวก ง) ทำกรรมวิธีละ 3 ซ้ำๆ ละ 20 เมล็ด

ก.

ข.

ค.



ภาพที่ 6 การทำ Scarification แบบต่างๆ สำหรับการเพาะเมล็ดในสภาพโรงเรือน

4.2.2 การเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ

4.2.2.1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD โดยมี 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัยที่ 1 สูตรอาหารที่มีส่วนประกอบของธาตุอาหารหลักแตกต่างกัน จำนวน 4 สูตร คือ MS (1962), H–MS, VW (1949) ดัดแปลง และ White (1963) (ภาคผนวก จ ข้อที่ 6)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปัจจัยที่ 2 อิทธิพลของน้ำมะพร้าว มี 2 ระดับ คือ ไม่เติมน้ำมะพร้าว และเติมน้ำมะพร้าว 15 %

จากนั้นนำเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วตามวิธีการในข้อ 4.1 มาเพาะลงบนอาหารสูตรต่างๆ ตามกรรมวิธีทดลองทั้ง 8 สูตร ทำกรรมวิธีละ 20 ซ้ำๆ ละ 1 เมล็ด

4.2.2.2 ศึกษาการทำ Scarification ที่เหมาะสมในสภาพปลอดเชื้อ

วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยการทำ Scarification 3 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 กรรมวิธีควบคุม (ภาพที่ 7 ก)

กรรมวิธีที่ 2 ตัดปลายเมล็ดออกประมาณ 0.1 มม (ภาพที่ 7 ข)

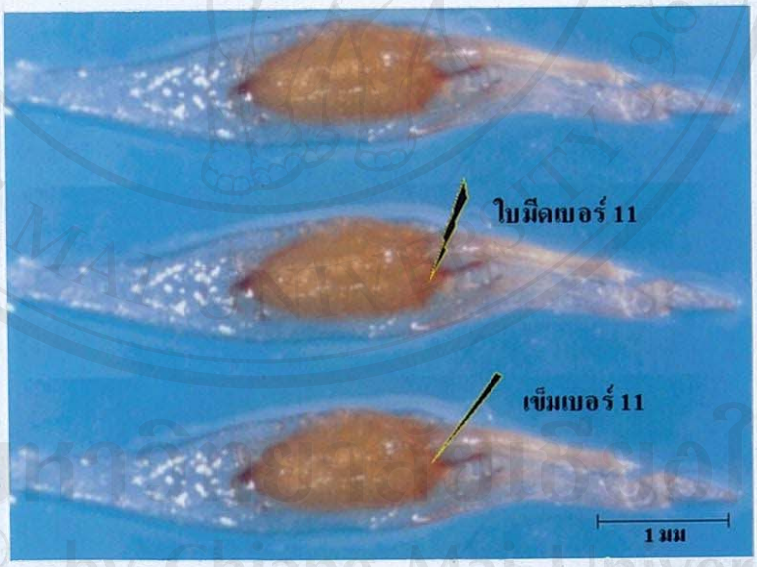
กรรมวิธีที่ 3 ใช้เข็มขนาดเล็กเจาะปลายเมล็ด (ภาพที่ 7 ค)

นำเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยวิธีการเดียวกับข้อ 4.1 มาทำ Scarification ตามกรรมวิธีต่างๆ จากนั้นนำมาเพาะบนอาหารสูตร VW (1949) ดัดแปลง (ภาคผนวก จ ข้อที่ 6 กรรมวิธีที่ 5) ทำกรรมวิธีละ 20 ซ้ำๆ ละ 1 เมล็ด

ก.

ข.

ค.

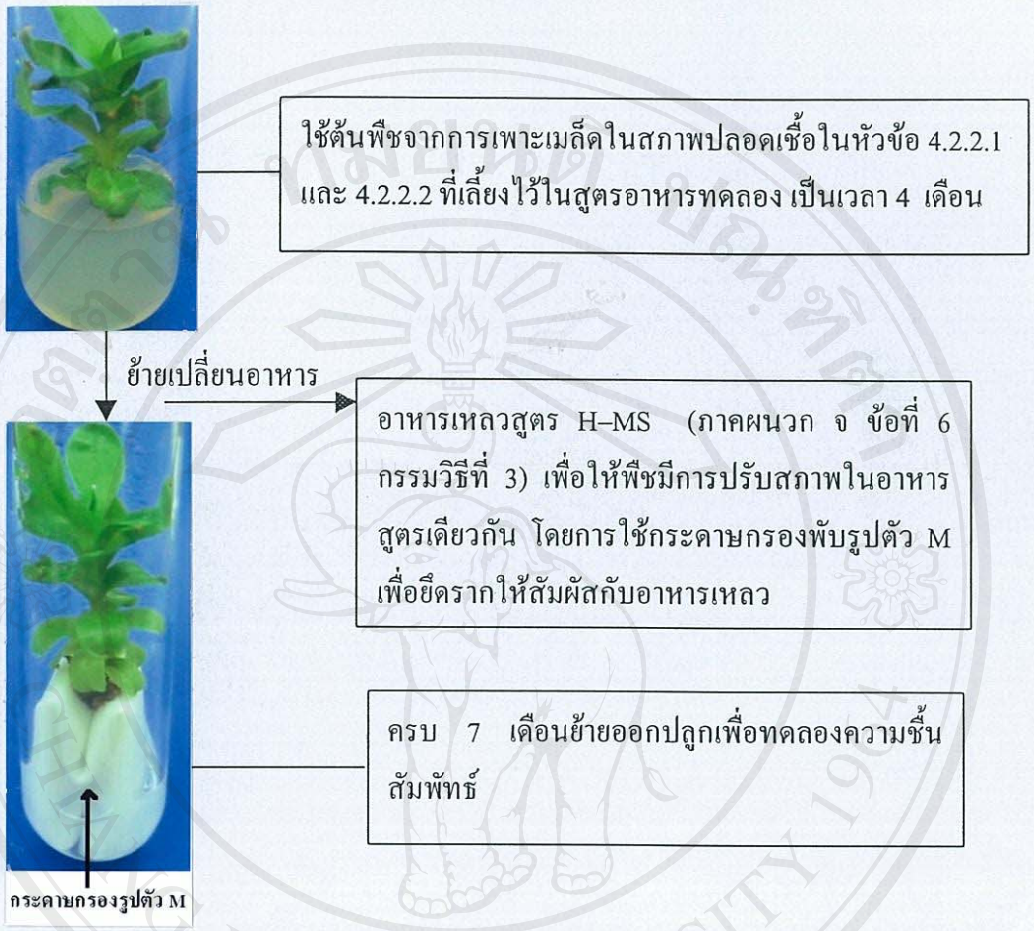


ภาพที่ 7 การทำ Scarification แบบต่างๆ สำหรับการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2.3 ความชื้นสัมพัทธ์ที่มีผลต่อการย้ายปลูกต้นกล้าหม้อข้าวหม้อแกงลิง

4.2.3.1 การเตรียมพืชทดลอง



ภาพที่ 8 การเตรียมพืชทดลองเพื่อใช้ในหัวข้อ 4.2.3.2

4.2.3.2 ขั้นตอนการศึกษา

นำต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อปลูกลงในตระกร้าพลาสติกขนาด 13 x 20 x 6 ซม โดยใช้ถ่านแกลบเป็นวัสดุปลูก รดน้ำให้ชื้น จากนั้นเก็บตระกร้าในถุงพลาสติกขนาด 12 x 24 นิ้ว ใช้ตะเกียบพลาสติกทำเป็นเสาไว้ด้านในถุงป้องกันการยุบตัวของถุง (ภาพที่ 9) มัดปากถุงไว้ 2 สัปดาห์ จากนั้นเปิดปากถุงเพื่อนำหลอดพลาสติกเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.3 ซม ใส่ไว้ที่ปากถุงเป็นช่องระบายอากาศ และความชื้น จำนวนหลอดที่ใช้ขึ้นอยู่กับแต่ละกรรมวิธี โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD 4 กรรมวิธีๆ ละ 5 ซ้ำๆ ละ 2 ต้น ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 1 ใส่หลอดจำนวน 1 หลอด ทุกๆ สัปดาห์ รวม 6 หลอด

กรรมวิธีที่ 2 ใส่หลอดจำนวน 1 หลอด ทุกๆ 2 สัปดาห์ รวม 3 หลอด

กรรมวิธีที่ 3 ใส่หลอดจำนวน 2 หลอด ทุกๆ 2 สัปดาห์ รวม 6 หลอด

กรรมวิธีที่ 4 ใส่หลอดจำนวน 4 หลอด ทุกๆ 2 สัปดาห์ รวม 12 หลอด

นำต้นไม้ที่ย้ายปลูกในแต่ละกรรมวิธีมาเลี้ยงในห้องควบคุมที่จัดให้มีอุณหภูมิโดยเฉลี่ย 27 – 28 °ซ และความเข้มแสงเฉลี่ย 4,200 ลักซ์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์

ภาพที่ 9 การใช้เสาพยุงป้องกันการยุบตัวของถุงพลาสติก

4.3 การขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

4.3.1 ผลของ BAP ต่อการแตกยอดของชิ้นส่วนพืช

นำต้นกล้าที่เตรียมไว้เช่นเดียวกับข้อ 4.2.3.1 ซึ่งมีอายุครบ 5 เดือน มาตัดแบ่งออก เป็น 2 ส่วน คือชิ้นส่วนยอด และชิ้นส่วนโคน โดยตัดให้แต่ละชิ้นส่วนเหลือ 3–4 ใบ และตัดปลายใบออกให้เหลือติดกับลำต้นยาวประมาณ 4–5 มม มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS (1962) (ภาคผนวก จ ข้อที่ 7) ที่เติม BAP ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD มี 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัยที่ 1 แบบของชิ้นส่วน จำนวน 2 แบบ คือชิ้นส่วนยอด และชิ้นส่วนโคน

ปัจจัยที่ 2 อาหารสูตร MS(1962) เติม BAP ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5 มก/ล

รวม 10 กรรมวิธี ทำกรรมวิธีละ 5 ซ้ำๆ ละ 1 ชิ้นส่วน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3.2 ผลของ IBA ต่อการเกิดรากของชิ้นส่วนยอด

4.3.2.1 การเตรียมพืชทดลอง

ใช้ต้นอ่อนที่ได้จากการชักนำการแตกยอดโดยใช้ BAP จากหัวข้อ 4.3.1

ตัดส่วนยอดที่แตกใหม่เลี้ยงในอาหารสูตรMS (1962) เติม BAP 0.5 มก/ล เพื่อให้พืชมีการปรับสภาพในอาหารสูตรเดียวกัน เป็นเวลา 3 เดือน

ตัดเอาเฉพาะส่วนยอดมาทำการทดลอง

ภาพที่ 10 การเตรียมพืชทดลองเพื่อใช้ในหัวข้อ 4.3.2.2

4.3.2.2 นำชิ้นส่วนยอดมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS (1962) (ภาคผนวก จ ข้อที่ 8) ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0, 0.1 0.5, 1.0 และ 2.0 มก/ล โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD 5 กรรมวิธี ทำกรรมวิธีละ 10 ซ้ำๆ ละ 1 ยอด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สถานที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย และรวบรวมข้อมูล

อาคารเพาะชำ และห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

พฤศจิกายน 2544 – ตุลาคม 2546

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved