

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาผลของการให้สภาพวันสั้นร่วมกับอุณหภูมิต่ำของกล้วยไม้ช้างเผือกต่อการออกดอกนอกฤดูของช้างเผือก แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของสภาพวันสั้นร่วมกับอุณหภูมิต่ำต่อการเจริญเติบโต การ ออกดอก คุณภาพช่อดอก และคุณภาพดอกของกล้วยไม้ช้างเผือก

วัสดุพืช

ทำการคัดเลือกกล้วยไม้ช้างเผือกอายุ 3 ปี ซึ่งผ่านการออกดอกมาแล้ว ต้นมีลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง ใบ ลำต้น และราก สมบูรณ์ไม่เป็นโรค เลือกต้นที่มีขนาดใกล้เคียงกันและเป็นต้นที่ยังไม่มีการพัฒนาของตาดอก จำนวน 280 ต้น



ภาพที่ 2 กล้วยไม้ช้างเผือกอายุ 3 ปี

วิธีการปลูก

ปลดต้นกระถางกล้วยไม้ซึ่งมีกล้วยไม้ที่อยู่ออกจากหลอดแขวน นำเอาถ่านทุบละเอียดใส่ลงในกระถาง และเอาสเฟกนัมมอสที่แช่น้ำทิ้งไว้ 1 คืน นำมาคลุมรอบๆ โคนต้น เพื่อรักษาความชื้น

วัสดุอุปกรณ์

1. ตู้ควบคุมการเจริญเติบโต (Growth Chamber)



ภาพที่ 3 ตู้ควบคุมการเจริญเติบโต (Growth Chamber)

2. ถาดใส่ต้นไม้
3. เครื่องสเปรย์น้ำ
4. ปุ๋ยเกล็ดละลายน้ำสูตร 21-21-21
5. ไม้บรรทัด
6. เวอร์เนียร์คาลิปเปอร์
7. ป้ายพลาสติก
8. กล้องดิจิทัล

วิธีการทดลอง

วิธีการวางแผนงานวิจัย

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) แบ่งเป็น 10 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 4 ซ้ำ ซ้ำละ 7 ต้น

กรรมวิธีที่ 1 สภาพแสงปกติ ร่วมกับอุณหภูมิปกติ

กรรมวิธีที่ 2 สภาพวันสั้นร่วมกับอุณหภูมิ 18 °C เริ่มการทดลองเดือนมีนาคมระยะเวลา 30 วัน

กรรมวิธีที่ 3 สภาพวันสั้นร่วมกับอุณหภูมิ 18 °C เริ่มการทดลองเดือนมีนาคมระยะเวลา 60 วัน

กรรมวิธีที่ 4 สภาพวันสั้นร่วมกับอุณหภูมิ 18 °C เริ่มการทดลองเดือนมีนาคมระยะเวลา 90 วัน

กรรมวิธีที่ 5 สภาพวันสั้นร่วมกับอุณหภูมิ 18 °C เริ่มการทดลองเดือนเมษายนระยะเวลา 30 วัน

กรรมวิธีที่ 6 สภาพวันสั้นร่วมกับอุณหภูมิ 18 °C เริ่มการทดลองเดือนเมษายนระยะเวลา 60 วัน

กรรมวิธีที่ 7 สภาพวันสั้นร่วมกับอุณหภูมิ 18 °C เริ่มการทดลองเดือนเมษายนระยะเวลา 90 วัน

กรรมวิธีที่ 8 สภาพวันสั้นร่วมกับอุณหภูมิ 18 °C เริ่มการทดลองเดือนพฤษภาคมระยะเวลา 30 วัน

กรรมวิธีที่ 9 สภาพวันสั้นร่วมกับอุณหภูมิ 18 °C เริ่มการทดลองเดือนพฤษภาคมระยะเวลา 60 วัน

กรรมวิธีที่ 10 สภาพวันสั้นร่วมกับอุณหภูมิ 18 °C เริ่มการทดลองเดือนพฤษภาคมระยะเวลา 90 วัน

ขั้นตอนการทดลอง

1. ตั้งโปรแกรมของผู้ควบคุมสภาพแวดล้อม ควบคุมความชื้น อุณหภูมิ และแสง ให้ความเข้มแสง $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ความชื้นสัมพัทธ์ 80 % เป็นระยะเวลา 10 ชั่วโมงร่วมกับอุณหภูมิ 25 °C และในสภาพมืดเป็นระยะเวลา 14 ชั่วโมงร่วมกับอุณหภูมิ 18 °C

2. นำต้นกล้วยไม้มาวางเรียงใน ถาดพลาสติก วางบนชั้นของผู้ควบคุมอุณหภูมิ ให้ต้นห่างจากกระจกพอสมควร เพื่อไม่ให้ความร้อนจากหลอดไฟทำลายใบของต้น ทำการรดน้ำ เช้า และเย็นด้วยกระบอกฉีดน้ำให้ชื้น และคอยเติมน้ำในถังรักษาความชื้น รวมถึงเทน้ำที่ใช้แล้วทิ้ง

วิธีการบันทึกผล



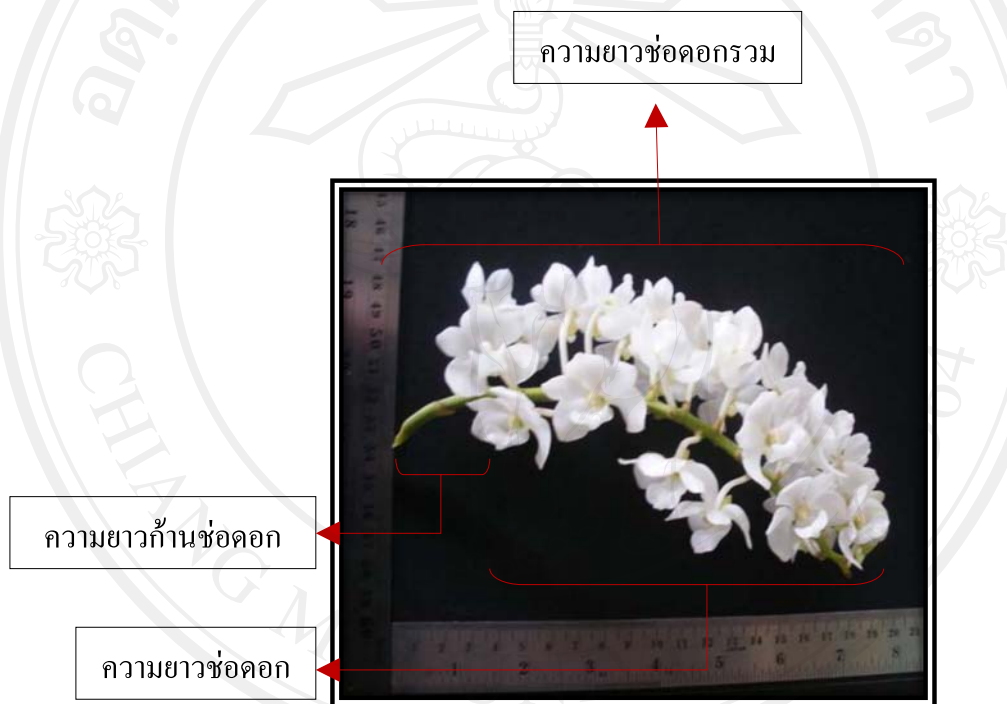
ภาพที่ 4 แสดงความสูงลำต้นวัดจากโคนต้นถึงปลายยอด

1. การเจริญเติบโต เช่น ความสูงลำต้น (ภาพที่ 4) ความกว้างทรงพุ่มเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น จำนวนใบต่อต้น ความกว้างใบ ความหนาใบ และ ความยาวใบ

2. ระยะเวลาการพัฒนาของดอกและการบานดอก

จำนวนวันที่สังเกตเห็นตาดอก (นับจากเริ่มทดลอง วันที่ 1 มีนาคม 2552) จำนวนวันที่สังเกตเห็นดอกแรกบาน (นับจากเริ่มทดลอง วันที่ 1 มีนาคม 2552) และ จำนวนวันตั้งแต่ดอกเริ่มบานจนดอกเหี่ยวหมดช่อ

3. คุณภาพช่อดอกและดอก



ภาพที่ 5 แสดงความยาวช่อดอกรวม ความยาวช่อดอก และความกว้างก้านช่อดอก

คุณภาพช่อดอก เช่น เปอร์เซ็นต์การออกดอก จำนวนช่อดอกต่อต้น ความยาวช่อดอก รวม ความยาวช่อดอก ความกว้างช่อดอก ความยาวก้านช่อดอก เส้นผ่าศูนย์กลางก้านช่อดอก

คุณภาพดอก เช่น จำนวนดอกต่อช่อ ความกว้างดอก ความยาวดอก และ เส้นผ่าศูนย์กลางก้านดอก

การทดลองที่ 2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแป้งและน้ำตาลของกล้วยไม้ช้างเผือก
ในระยงก่อนออกดอก ระหว่างออกดอก และหลังออกดอก

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์

- 1.1.1 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ของบริษัท HITACHI รุ่น U-2001
- 1.1.2 เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- 1.1.3 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
- 1.1.4 โกร่งบดตัวอย่างพืช
- 1.1.5 ถุงพลาสติกเก็บตัวอย่างพืช
- 1.1.6 ถุงกระดาษเก็บตัวอย่างสด
- 1.1.7 กระดาษชำระ
- 1.1.8 ป้ายชื่อพร้อมปากกาเคมี
- 1.1.9 ตู้อบตัวอย่างพืช
- 1.1.10 ขวดพลาสติก ขนาด 60 ml
- 1.1.11 ขวดพลาสติก ขนาด 120 ml
- 1.1.12 เครื่องแก้ว
 - 1.1.12.1 หลอดทดลอง ขนาด 25×200 ml
 - 1.1.12.2 บีกเกอร์
 - 1.1.12.3 กระจกตวง
 - 1.1.12.4 กรวยกรอง
 - 1.1.12.5 ขวดปรับปริมาตร
 - 1.1.12.6 ปีเปดแก้ว
 - 1.1.12.7 ไมโครปีเปด
 - 1.1.12.8 หลอดหยดสาร
 - 1.1.12.9 แท่งแก้วคนสาร
 - 1.1.12.10 ช้อนตักสาร

วิธีการทดลอง

สุ่มเก็บตัวอย่างใบกล้วยไม้ช้างเผือก เก็บ 1 ใบ ต่อ 1 ชำ และเก็บ 3 ชำ ในทุกกรรมวิธี ทำการเก็บใบที่ตรงข้ามกับช่อดอก นำมาอบแห้งเพื่อการวิเคราะห์ โดยทำการเก็บ 3 ระยะดังแสดงในภาพ



ก

ข

ค

ภาพที่ 4 ระยะการเก็บตัวอย่างใบกล้วยไม้เพื่อวิเคราะห์ ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้าง และน้ำตาลรีดิวซ์ ก. ก่อนออกดอก ข. ระหว่างออกดอก ค. หลังออกดอก

ขั้นตอนการวิเคราะห์ความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้างและน้ำตาลรีดิวซ์

การสกัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้างและน้ำตาลรีดิวซ์

1. การเตรียมตัวอย่างพืชสำหรับวิเคราะห์ ความเข้มข้นคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้างและน้ำตาลรีดิวซ์

เก็บตัวอย่างใบกล้วยไม้เลือกใบที่อยู่ตรงข้ามกับช่อดอก ล้างทำความสะอาดด้วย น้ำกลั่น 3 ครั้ง ซับให้แห้งจากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักสด บันทึกน้ำหนักสด แล้วนำไป บรรจุในถุงกระดาษอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 3 สัปดาห์ จนกระทั่งน้ำหนักแห้งไม่เปลี่ยนแปลง จึงนำมาชั่งน้ำหนักแห้ง บันทึกน้ำหนักแห้ง หลังจากนั้นนำไปบดด้วยโกร่งบดให้เป็นผงละเอียด เก็บใส่ถุงพลาสติกใสก่อนนำไปชั่งเพื่อใช้สกัดและวิเคราะห์

2. การสกัดคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้างจากตัวอย่างพืช (Smith *et al.*, 1964)

ชั่งตัวอย่างพืชอบแห้งที่บดละเอียดประมาณ 0.2 g ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) 0.2 N 40 ml ปิดหลอดด้วยแผ่นอะลูมิเนียม นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น ปรับ pH ให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 ml กรองด้วยกระดาษกรอง Whatmann® เบอร์ 5 เทใส่ขวดพลาสติกเก็บไว้สำหรับวิเคราะห์ต่อไป

3. การสกัดน้ำตาลรีดิวซ์จากตัวอย่างพืช (Yemm, 1935)

ซึ่งตัวอย่างพืชอบแห้งที่บดละเอียดประมาณ 0.2 g ใส่ลงในหลอดทดลอง เติม ethanol 85% 20 ml ปิดหลอดด้วยแผ่นอะลูมิเนียม นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 2 ชั่วโมงเขย่าหลอดทดลองทุกครึ่งชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้เป็น 50 ml กรองด้วยกระดาษกรอง Whatmann® เบอร์ 5 เทใส่ขวดพลาสติกเก็บไว้สำหรับวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์ ความเข้มข้นของ คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้างและน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Nelson's reducing sugar procedure (A.O.A.C., 1990)

1. เตรียมสารละลาย Nelson's alkaline copper reagent

Nelson's reagent A: ชั่งแอนไฮดรัสโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 25 g โซเดียมโพแทสเซียมทาทาเตต ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 25 g โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) 25 g และแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) 200 g ละลายในน้ำกลั่น คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

Nelson's reagent B: ชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO_4) 15 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น (H_2SO_4) 2 หยด คนให้เข้ากัน ผสม Nelson's reagent A 20 ml กับ Nelson's reagent B 0.8 ml คนให้เข้ากัน

2. เตรียมสารละลาย arsenomolybolic acid reagent

ชั่งแอมโมเนียมโมลิบเดต ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 25 g ละลายในน้ำกลั่น 450 ml เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น (H_2SO_4) 21 ml และ ชั่งโซเดียมไฮโดรเจนอาซานาต ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 3 g ละลายในน้ำกลั่น 25 ml นำสารละลายทั้งหมดมาผสมกันเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้องนาน 2 วัน ก่อนนำมาใช้ได้ต้องมีสีเหลืองอ่อนเท่านั้น

3. เตรียมสารละลายมาตรฐานของดิกลูโคส ความเข้มข้น 0, 0.02, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18 และ 0.20 mg/ml เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

4. ดูดสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2 สำหรับวิเคราะห์ ความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้าง และ สารละลายตัวอย่างจากข้อ 3 สำหรับวิเคราะห์ ความเข้มข้นของ น้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาตร 1 ml ลงในหลอดทดลอง เติม Nelson's alkaline copper reagent หลอดละ 1 ml เขย่าให้เข้ากัน ปิดด้วยแผ่นอะลูมิเนียม แล้วนำไปวางในน้ำเดือดนาน ประมาณ 20 นาที จากนั้นนำออกมาทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติม arsenomolybolic acid reagent หลอดละ 0.25 ml เขย่าจนตะกอนละลายแล้วเติมน้ำกลั่นหลอดละ 7.75 ml เขย่าให้เข้ากัน นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 540 nm นำค่าที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ ดิกลูโคส จากนั้นนำค่าที่คำนวณ

ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้าง และน้ำตาลรีดิวิซ์ (mg D-glucose/g dry weight) โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

ความเข้มข้นของ คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้างและน้ำตาลรีดิวิซ์ในตัวอย่างพืช (mg D-glucose/g dry weight) = $((A \times B)/(C \times D)) \times$ น้ำหนักแห้งในส่วนนั้นของพืช

สาร A = ค่าความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน (mg/l)

B = ปริมาตรสุดท้ายของการสกัดตัวอย่างพืช (TNC = 100 ml และ RS = 50 ml)

C = น้ำหนักแห้งของตัวอย่างที่ใช้สกัด (g)

D = ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ (ml)

สถานที่ใช้ดำเนินการวิจัยและเก็บข้อมูล

1. เรือนกล้วยไม้โครงการการพัฒนาไม้ดอกเศรษฐกิจ (กล้วยไม้) เพื่อเพิ่มศักยภาพในการส่งออก ศูนย์ วิจัยสาริตและ ผีกรอบกรมการเกษตรแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการทางสรีรวิทยา ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการธาตุอาหาร ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
4. ห้องปฏิบัติการทางเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาการดำเนินงานวิจัยและเก็บข้อมูล

ระหว่างเดือนมีนาคม 2552 ถึง เดือนมิถุนายน 2553