

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผักกาด้วยไม้ช้างกระ โดยพิจารณาจากผักที่มีลักษณะสีเขียวเหลือง ซึ่งมีอายุประมาณ 80-120 วัน ซึ่งเป็นระยะที่ผักเริ่มแก่ และเหมาะต่อการนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเพาะเลี้ยงผักกาด้วยไม้ในสูตรอาหารมาตรฐาน Vacin and Went (1949) เพื่อชักนำให้เกิดเป็น โปรโตคอมส์ และนำไปเลี้ยงบนอาหาร Vacin and Went (1949) เปรียบเทียบกับสูตรของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.1 ข้อมูลและแหล่งที่มาของข้อมูล

รวบรวมผักกาด้วยไม้ช้างกระ และศึกษาส่วนประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตรของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.2 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากรผักกาด้วยไม้ช้างกระ 10 ผัก

กลุ่มตัวอย่าง กาด้วยไม้ช้างกระ ที่วางจำหน่ายในอุทยานเกษตร มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.3 แผนการวิจัย

3.3.1 การศึกษาการงอกของเมล็ดของกาด้วยไม้ช้างกระที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ Vacin and Went (1949) เปรียบเทียบกับสูตรของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.4 เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

- 1) ผักช้างกระ
- 2) สารละลายคลอไรด์
- 3) Tween 20
- 4) สารละลายเอริลอัลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์

- 5) น้ำกลั่น
- 6) เตาอุ่นความร้อน และเครื่องคนสาร
- 7) เครื่องแก้วขนาดต่าง ๆ
- 8) ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเชื้อ 8 ออน และ 12 ออน
- 9) เครื่องชั่งแบบหยด และแบบละเอียด
- 10) ตะเกียงอัลกอฮอล์ กระจกaylor
- 11) มีดผ่าตัด และใบมีด
- 12) คีมกรีด
- 13) เครื่องปั่นน้ำผลไม้
- 14) จานเพาะเชื้อ
- 15) ผ้าขาวบาง
- 16) สารเคมีเตรียม stock อาหาร
- 17) ใยสูตรสม่ำเสมอ
- 18) น้ำมะพร้าว
- 19) น้ำตาลทราย
- 20) วิตามินบีรวม

3.5 การเก็บรวบรวมข้อมูล

เก็บรวบรวมข้อมูล โดยศึกษาตัวอย่างกล้วยไม้ช้างกระ ดังนี้

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
 2. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์
 3. ศึกษาระยะเวลาในการเพาะฝักกล้วยไม้ช้างกระ
 4. การศึกษาการงอกของเมล็ดของกล้วยไม้ช้างกระที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์
- Vacin and Went (1949) เปรียบเทียบกับสูตรของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.6 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผักกล้วยไม้ช้างกระ

1. การเตรียมสารละลายคั้นต่อสูตร Vacin and Went (1949)

1.1 การเตรียมสารอาหารหลัก เป็นสารที่ต้องการใช้ในปริมาณที่มาก มักชั่งและละลายรวมกันในขวดใบเดียวกัน เรียกว่า Stock I (Macro media) เตรียม 10 เท่า มีส่วนประกอบดังนี้

ชื่อสารเคมี	สูตรเคมี	ปริมาณที่ใช้ (mg/l)
potassium nitrate	KNO_3	525
potassium dihydrogen - phosphate	KH_2PO_4	250
magnesium sulfate	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	250
ammonium sulfate	$(NH_4)_2SO_4$	500

1.2 การเตรียมสารอาหารรอง เป็นสารที่ต้องการใช้ในปริมาณที่น้อย และชั่งไม่ได้ มักชั่งและละลายรวมกันในขวดใบเดียวกัน เรียกว่า Stock II (Micro media) เตรียม 100 เท่า มีส่วนประกอบดังนี้

ชื่อสารเคมี	สูตรเคมี	ปริมาณที่ใช้
manganese sulfate	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	7.5 g

1.3 การเตรียมธาตุเหล็ก เป็นสารที่ต้องการใช้ในปริมาณที่ปานกลาง และมักทำการแยกต่างหาก มักชั่งและละลายรวมกันในขวดใบเดียวกัน เรียกว่า Stock III (เหล็ก) เตรียม 100 เท่า มีส่วนประกอบดังนี้

ชื่อสารเคมี	สูตรเคมี	ปริมาณที่ใช้
Ferric sulphate	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1.3925 g
Sodium di EDTA	Na_2EDTA	1.865 g

2. การเตรียมอาหารสังเคราะห์สำหรับการเพาะเลี้ยงผักกาดด้วยไม้อูตร Vacin and Went (1949)

การเตรียมอาหารแข็ง ปริมาตรอาหารที่เตรียม คือ 1,000 มิลลิกรัม

สารเคมี (stock)	ปริมาณที่ใช้
Stock I (Macro Media)	100 ml
Stock II (Micro Media)	10 ml
Stock III (เหล็ก)	10 ml
calcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)	200 mg
น้ำตาล sucrose	20 g
น้ำมะพร้าว (coconut water)	150 ml
มันฝรั่ง (น้ำคั้นมันฝรั่ง)	100 g หรือ 100 ml
กล้วยหอมบด	100 g
ผงถ่าน	2 g
วุ้น	7 g
pH	4.8-5.0

เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิกรัม คนให้เข้ากันทั่วแล้วนำไปปรับค่าความเป็นกรด เป็นด่าง ให้ได้ 4.8-5.0 ด้วย 1N HCl หรือ 1 N NaOH จะได้อาหารสังเคราะห์ในรูปอาหารเหลว (liquid media) นำไปวัด pH ก่อนนำไปต้ม

ต้มจนวุ้นละลายหมด แล้วบรรจุลงในขวดบรรจุอาหารที่เป็นขวดแก้ว ปิดฝาให้เรียบร้อย แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที นำออกจากหม้อนึ่งความดัน ปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

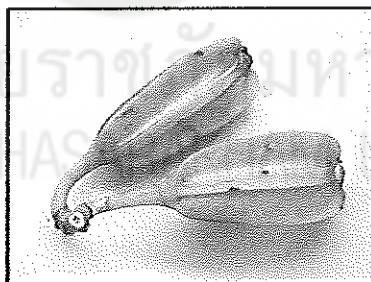
3. การเตรียมอาหารสังเคราะห์สำหรับการศึกษาเพาะเลี้ยงผักกาดด้วยไม้สูตรของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

สารเคมี (stock)	ปริมาณที่ใช้
ปุ๋ยสูตรเสมอ (21-21-21)	2 g/l
น้ำมะพร้าว	120 ml/l
น้ำตาลทราย	30 กรัม
วิตามินบีรวม	1-2 mg/l
ผงวุ้น	8 กรัม

ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปต้มจนวุ้นละลายหมด แล้วบรรจุลงในขวดบรรจุอาหารที่เป็นขวดแก้ว ปิดฝาให้เรียบร้อย แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที นำออกจากหม้อนึ่งความดัน ปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเชื้อ

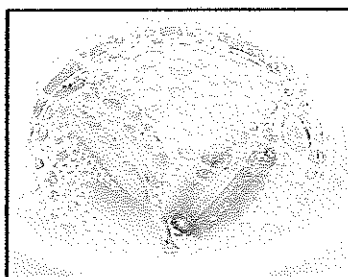
4. ขั้นตอนในการเพาะผักกาดด้วยไม้ข้างกระ

1. ล้างผักกาดด้วยไม้ให้สะอาด



ภาพที่ 3.1 ผักกาดด้วยไม้ข้างกระ

2. หุงผักด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70 % และฟอกด้วยสารฟอกฆ่าเชื้อคลอรีน 5% และ 10 %



ภาพที่ 3.2 การฟอกฆ่าเชื้อผักกาดด้วยไม้ข้างกระ

3. ทนไฟให้ไฟลูดนอกปลวตะเกียง



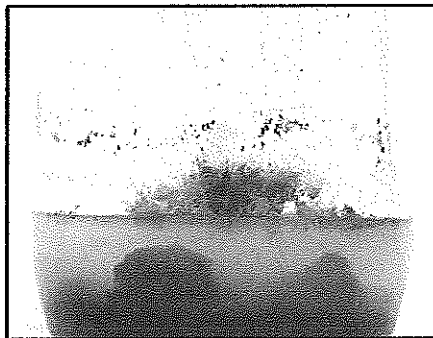
ภาพที่ 3.3 การทนไฟฆ่าเชื้อฝักกล้วยไม้ช้างกระ

4. วางบนจานแก้ว ตัดหัวท้ายของฝัก และผ่ากลางด้วยมีด



ภาพที่ 3.4 การผ่าฝักกล้วยไม้ช้างกระ

5. สืบเอาเมล็ดมาเพาะในอาหารสังเคราะห์ Vacin and Went (1949) เปรียบเทียบกับสูตรของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)



ภาพที่ 3.5 การวางเมล็ดกล้วยไม้ช้างกระบนอาหารสังเคราะห์

6. เก็บในห้องควบคุมอุณหภูมิ และเปิดไฟให้เนื้อเยื่อ 12 ชั่วโมงต่อวัน

7. ใช้เทคนิคปลอดเชื้อย้ายอาหารใหม่ทุกๆ เดือน จนได้ต้นที่มีราก

8. นำออกปลูกบนขุยมะพร้าว หรือถ่านป่น แล้วย้ายไปปลูกในโรงเรือน จะได้ต้นกล้วยไม้ที่มีดอกสีต่างๆ เหมาะที่จะทำการคัดพันธุ์ต้นที่ดี เช่น ใช้ในการตัดดอก แล้วนำตาไปขยายพันธุ์ โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป

9. ระยะเวลาในการศึกษาการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ข้างกระเป็นเวลา 4 สัปดาห์

5. ขั้นตอนในการศึกษาความเหมาะสมของอาหารที่จะนำไปชักนำให้เกิดต้นและราก

5.1 นำโปรโตคอร์มที่ได้จากการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ข้างกระจากการทดลองที่ 4 จากสูตรที่ให้การเจริญเติบโตดีที่สุดมาเพาะลงในอาหารสูตรมาตรฐาน Vacin and Went (1949) และสูตรของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) เพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโต

5.2 ทำการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตเป็นเวลา 8 สัปดาห์

5.3 ทำการวัดการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ข้างกระเพื่อใช้เปรียบเทียบการเจริญเติบโต

1. วัดความสูงของต้นกล้วยไม้
2. วัดขนาดความกว้าง ความยาวของใบ
3. นับจำนวนใบต่อต้นของกล้วยไม้ข้างกระ
4. นับจำนวนราก และวัดขนาดของราก

3.7 ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

เดือนตุลาคม 2553 – เดือนกันยายน 2554 ทำการรวบรวมเอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดำเนินการวิจัย สรุปผล และเขียนรูปเล่มรายงาน

แผนการดำเนินงานวิจัยตลอดตลอดโครงการ

แผนการดำเนินงาน	ระยะเวลาดำเนินงาน (เดือนตุลาคม 2553 – เดือนกันยายน 2554)											
	ต.ค	พ.ย	ธ.ค	ม.ค	ก.พ	มี.ค	เม.ย	พ.ค	มิ.ย	ก.ค	ส.ค	ก.ย
1. ศึกษาเอกสารที่เกี่ยวข้อง												
2. เปรียบเทียบการ สารอินทรีย์ในอาหาร	←	→										
3. เปรียบเทียบฮอร์โมนใน การเจริญเติบโต			←	→								
4. วิเคราะห์ผลข้อมูล						←	→					
5. สรุปและรายงานผล										←	→	



มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY