

### บทที่ 3

## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### อุปกรณ์

1 พืชที่ใช้ในการทดลอง คือ หวายโป่ง (*Calamus latifolius* Roxb.)

2 อุปกรณ์และวัสดุ

อุปกรณ์ในการศึกษาน้ำหนัก ความชื้น เปรอร์เซ็นต์การงอก การเก็บรักษา และการทดสอบความมีชีวิตของเมล็ดหวายโป่ง ดังนี้

กระบะฝังเมล็ด เครื่องชั่งไฟฟ้า กระป๋องอลูมิเนียม โดแก้วบรรจุซิดิกาเจล ตู้อบทราย ขี้เถ้าแกลบ เวอร์มิคิวไลต์ เครื่องอบดิน กล่องเพาะเมล็ด ห้องเพาะเมล็ด ถุงพลาสติก ถุงอลูมิเนียมฟอล์ย ถุงพลาสติกบรรจุขี้เถ้าแกลบชื้น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (ตู้เย็น) กรรไกรตัดกิ่งไม้ เครื่องเอกซ์เรย์ (Hewlett Packard Model 43804) ฟิล์มโกดัก AA 4 x 10 นิ้ว

3 สารเคมี

ซิดิกาเจล กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2,3,5 - Triphenyltetrazolium choride

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ น้ำยาล้างฟิล์มเอกซ์เรย์ (Developer และ Fixer)

### วิธีการทดลอง

1 การศึกษาน้ำหนัก 1,000 ผล และน้ำหนัก 1,000 เมล็ด

1.1 ศึกษาน้ำหนักต่อ 1,000 ผลของผลหวายโป่ง โดยการสุ่มผลหวายโป่งที่เก็บมาใหม่ จำนวน 8 ซ้ำ ๆ ละ 100 ผล ชั่งหาน้ำหนักและ นำไปคำนวณหาน้ำหนักของ 1,000 เมล็ด โดยวิธีของ ISTA (1985)

1.2 ศึกษาน้ำหนักต่อ 1,000 เมล็ด โดยทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดที่ป็นจากผลหวายโป่งที่เก็บมาใหม่ จำนวน 8 ซ้ำ ๆ ละ 100 เมล็ด คำนวณหาน้ำหนักต่อ 1,000 เมล็ด โดยวิธีของ (ISTA, 1985)

2 การศึกษาปริมาณความชื้นภายในผลและเมล็ดหวายโป่ง

2.1 การหาปริมาณความชื้นในผล นำผลหวายโป่งมาผึ่งในที่ร่มอากาศถ่ายเทสะดวก สุ่มผลหวายมา 4 ซ้ำๆละ 10 ผล นำไปชั่งหาน้ำหนักสด แล้วนำไปอบที่ 105 °C เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 16 ชั่วโมง นำมาไว้ในโถแก้วที่บรรจุสารดูดความชื้น เพื่อให้เย็นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปชั่งหาน้ำหนักแห้งปฏิบัติเช่นเดียวกันทุก 2 วัน รวม 7 ครั้ง นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นของผล และพิจารณาการลดลงของความชื้นภายในผลในแต่ละช่วงเวลา

2.2 การหาปริมาณความชื้นในเมล็ด นำผลหว่ายโป่งมาป็นส่วนของเปลือก และเนื้อผล ออกเพื่อให้ได้เมล็ด กลุ่มเมล็ดหว่ายมาครั้งละ 10 เมล็ด 4 ซ้ำ นำไปชั่งหาน้ำหนักสดแล้วนำไปอบ ที่ 105°C เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 16 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวางให้เย็นในโถแก้วที่บรรจุซิลิกาเจลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปชั่งหาน้ำหนักแห้ง ปฏิบัติเช่นเดียวกันทุก 2 วัน รวม 7 ครั้ง นำค่าที่ได้ไป คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นของเมล็ด และพิจารณาการลดลงของความชื้นภายในเมล็ดในแต่ละ ช่วงเวลา

### สูตรที่ใช้คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นของผลและเมล็ด

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{(\text{น้ำหนักสด} - \text{น้ำหนักแห้ง})}{\text{น้ำหนักสด}} \times 100$$

### 3 การเก็บรักษาเมล็ดหว่ายโป่ง

3.1 การปฏิบัติต่อเมล็ดก่อนเก็บรักษา นำผลหว่ายโป่งมาป็นเพื่อส่วนส่วนของเปลือก และ เนื้อผลออก ผึ่งในที่ร่มอากาศถ่ายเทสะดวกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เมล็ดแห้ง กลุ่มเมล็ดตาม กฎของ ISTA (1985) หากความชื้นของเมล็ดที่ได้จากการรุ่มจำนวน 4 ซ้ำ ๆ ละ 5 เมล็ด เมล็ดส่วนที่ เหลือบรรจุในภาชนะชนิดต่าง ๆ คือถุงพลาสติก 72 ถุง ๆ ละ 220 เมล็ด ถุงอลูมิเนียมฟอล์ย 72 ถุง ๆ ละ 220 เมล็ด ถุงพลาสติกบรรจุซีดีเก่ากลับขึ้น 72 ถุง ๆ ละ 220 เมล็ด ขวดแก้วบรรจุซิลิกา เจล 12 ขวด ๆ ละ 220 เมล็ด และถาดอลูมิเนียม 2,700 เมล็ด เพื่อเก็บรักษาในอุณหภูมิต่าง ๆ ระยะเวลา 1 ปี โดยดำเนินการหาเปอร์เซ็นต์การงอกทุก 1 เดือนหลังจากเก็บรักษา

#### 3.2 ภาชนะที่ใช้ในการเก็บรักษาเมล็ดหว่ายโป่ง

3.2.1 ถุงพลาสติกใสขนาด 4 x 6 นิ้ว หนา 0.4 มิลลิเมตร

3.2.2 ถุงพลาสติกใสบรรจุซีดีเก่ากลับขึ้นขนาด 4 x 6 นิ้ว หนา 0.4 มิลลิเมตร

3.2.3 ถุงอะลูมิเนียมฟอล์ยขนาด 4 x 6 นิ้ว

3.2.4 ขวดแก้วบรรจุซิลิกาเจล อัตราส่วนซิลิกาเจลต่อเมล็ด เท่ากับ 1 ต่อ 1 ทำการ เปลี่ยนซิลิกาเจลเมื่อซิลิกาเจลเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพู จนกระทั่งซิลิกาเจลไม่เปลี่ยนสี

3.2.5 ภาชนะเปิด (ถาดอลูมิเนียม)

3.3 อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา -10°C, 0°C, 5°C, 10°C, 20°C, อุณหภูมิห้อง (25-30°C)

#### 4 การหาเปอร์เซ็นต์การงอก

การหาเปอร์เซ็นต์การงอก นำเมล็ดหว่ายโป่งที่เก็บรักษาในข้อ 3 มาเพาะหาเปอร์เซ็นต์การงอกในแต่ละเดือนในทุกปีงอก เมล็ดที่เก็บรักษาไว้ในแต่ละสภาพจะถูกนำมาเพาะ มีจำนวน 4 ซ้ำ ๆ ละ 50 เมล็ด วัสดุเพาะใช้ทราย ขนาดระหว่าง 0.05-0.8 มิลลิเมตร อบที่ 105 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บรรจุในกล่องเพาะเมล็ด ให้แสงประมาณ 85-125 แสงเทียน เป็นเวลา 8 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25°C เมื่อเพาะแล้วทำการตรวจนับเมล็ดที่งอก และให้ความชื้นแก่เมล็ดทุก 7 วัน การนับการงอกตามกฎของ ISTA (1985) คือ เมื่อรากงอกยาวเท่าเมล็ดจึงนับว่างอก ในเมล็ดหว่ายโป่งเริ่มตรวจนับเปอร์เซ็นต์การงอกหลังจากเพาะ 10-12 สัปดาห์ และระยะเวลาสิ้นสุดการตรวจนับเปอร์เซ็นต์การงอก 20 สัปดาห์ นำค่าที่ได้คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดในแต่ละช่วงของการเก็บรักษา

#### 5 การปฏิบัติต่อเมล็ดหว่ายโป่งก่อนเพาะ

##### 5.1 ชุดควบคุม

5.2 การปฏิบัติต่อเมล็ดโดยการแช่เมล็ดหว่ายโป่งในน้ำไหล ระยะเวลาในการแช่เมล็ดในน้ำไหล 6, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (25-30°C)

5.3 การปฏิบัติต่อเมล็ดโดยการแช่เมล็ดในน้ำร้อนปล่อยให้เย็น โดยต้มน้ำเดือด (95-97°C) เทเมล็ดใส่ในน้ำเดือดยกจากเตาทันทีตั้งทิ้งไว้ระยะเวลา 6, 12, 24, 36, และ 48 ชั่วโมง เมล็ดและน้ำจะค่อย ๆ ลดอุณหภูมิลงพร้อมกัน

5.4 การปฏิบัติต่อเมล็ด โดยการต้มเมล็ดในน้ำร้อนโดยต้มน้ำให้เดือด (95-97°C) นำเมล็ดใส่ตะแกรงลงในน้ำร้อน ระยะเวลาการต้มเมล็ดในน้ำร้อน 3, 5, 10, 15, 20 นาที

5.5 การปฏิบัติต่อเมล็ดโดยทำให้เมล็ดเป็นแผล (scarification) โดยตัดด้านตรงข้ามเอ็มบริโอ 1/4, 1/2, 3/4 และเปิดผิวเปลือกบริเวณตรงข้ามเอ็มบริโอของเมล็ด

5.6 การปฏิบัติต่อเมล็ด โดยการแช่กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ เทกรดซัลฟิวริกลงในเมล็ดปริมาณ 1-1.5 เท่าของเมล็ด คนด้วยแท่งแก้วเพื่อให้เมล็ดสัมผัสกรดให้ทั่ว จนครบเวลาที่กำหนด คือ 3, 5, 10, 15, 20 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาแยกเมล็ดออกจากกรดโดยเทเมล็ดลงบนตะแกรงลวด จากนั้นนำตะแกรงไปล้างในน้ำไหลประมาณ 5 นาที นำเมล็ดที่ได้ไปเพาะเพื่อหาเปอร์เซ็นต์การงอก

#### 6 การทดสอบความมีชีวิต

##### 6.1 การทดสอบความมีชีวิตของเมล็ดหว่ายโป่งโดยใช้เทระโซเลียม

โดยทำการทดลองกับเมล็ดที่ได้จากผลที่เก็บมาใหม่และเมล็ดที่เก็บรักษาในสภาพแห้งเป็นเวลา 6 เดือน การทดสอบใช้เมล็ดแต่ละตัวอย่าง 4 ซ้ำ ๆ ละ 50 เมล็ด การเตรียมเมล็ดโดยใช้กระดาษทรายถูบริเวณเอ็มบริโอ นำเมล็ดไปแช่ในน้ำไหลเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่สารละลายเกลือเทระโซเลียมเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แช่ให้ท่วมเมล็ดและห่อภาชนะด้วยกระดาษ

อุณหภูมิของฟิล์มเก็บที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆครั้ง ตรวจสอบความมีชีวิตโดยพิจารณาการติดสีของเอ็มบริโอ เพื่อประเมินค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตจากการติดสี

#### 6.2. การทดสอบความมีชีวิตของเมล็ดหวายโดยการฉายรังสีเอกซ์

การทดสอบความมีชีวิตโดยวิธีนี้เริ่มดำเนินการด้วยการหาค่า Kv (Kilovoltage) และระยะเวลาที่เหมาะสมในการฉายรังสีเอกซ์ต่อเมล็ดหวายโป่ง โดยเรียงเมล็ดหวายโป่งบนแผ่นพลาสติก แล้วนำฟิล์มใสของสีดำ จากนั้นนำเมล็ดที่เรียงในแผ่นพลาสติก วางบนของที่บรรจุฟิล์มแล้วนำไปวางในเครื่องเอกซ์เรย์เมล็ดปรับค่า Kv และระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง เมื่อครบกำหนดเวลา นำฟิล์มออกจากเครื่องเอกซ์เรย์ล้างใน Developer 5 นาที ล้างน้ำสะอาด และล้างใน Fixer 5 นาที ล้างน้ำสะอาดผึ่งให้แห้ง เครื่องเอกซ์เรย์ที่ใช้ (Hewlett Packard Model 43804) มีระยะห่างระหว่างแหล่งกำเนิดรังสีเอกซ์ และฟิล์มประมาณ 60 เซนติเมตร ฟิล์มที่ใช้คือ ฟิล์มโกดัก AA ขนาด 4 x 10 นิ้ว

**ตารางที่ 1** แสดงค่า Kilovoltage และระยะเวลาในการฉายรังสีเอกซ์

Kv (Kilovoltage)	ระยะเวลา (วินาที)
20	45
	50
	60
25	45
	50
	60
30	45
	50
	60

### 6.3 การทดสอบความมีชีวิตของเมล็ดหวายโดยการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ทดสอบโดยใช้สารละลาย  $H_2O_2$  เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ กับเมล็ดหวายที่ได้จากผลที่เก็บมาใหม่ และเมล็ดหวายที่เก็บรักษาไว้ในสภาพอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 เดือน การทดสอบเตรียมเมล็ดเป็น 2 ลักษณะคือ เมล็ดที่ได้ตัดปลายด้านตรงข้ามเอ็มบริโอ และเมล็ดที่ไม่ได้ตัดปลาย (control) ในแต่ละการทดลองใช้เมล็ดซ้ำละ 25 เมล็ด 4 ซ้ำ นำเมล็ดบรรจุในขวดที่มีสารละลาย  $H_2O_2$  ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และควรปิดฝาขวดไว้ทำการเปลี่ยนสารละลาย  $H_2O_2$  ทุก 12 ชั่วโมง ทำการตรวจนับการงอกของรากที่ไหล่ออกมาทุกวัน จนกระทั่งไม่มีการงอกเพิ่มขึ้น นำผลที่ได้ในแต่ละการทดลองไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเมล็ด

### 7. วางแผนการทดลอง และวิเคราะห์ผล

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) และวิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)



ภาพที่ 5 แสดงภาชนะสำหรับเก็บรักษาเมล็ดหวายไปง