บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 กล้วยไม้ดินลิ้นมังกร ซึ่งปลูกเลี้ยงภายใต้หลังคากันฝน และพรางแสง 50 เปอร์เซ็นต์

1.2 ตู้กรองอากาศ (air flow cabinet)

1.3 ชั้นสำหรับวางหลอดเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.4 เครื่องเขย่า

1.5 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance)

1.6 กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนซ์ส่องกลับ (inverted microscope)

1.7 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

1.8 หม้อนึ่งความดันไอ

1.9 เตาไฟฟ้า

1.10 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 50 มล

1.11 ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 500 และ 1,000 มล

1.12 หลอดทดลองขนาด 25 ×150 มม

1.13 ปิเปต

1.14 หลอดหยด

1.15 บีกเกอร์

1.16 กระบอกวัดปริมาตร

1.17 กรวยแก้ว

1.18 จานเพาะเชื้อ

1.19 ช้อนตักสาร

1.20 ขวดใส่สารละลายเข้มข้น

1.21 กระดาษอลูมิเนียมฟอยล์

1.22 วัสดุที่ใช้ในตู้กรองอากาศ ได้แก่

1.22.1 ด้ามมีดผ่าตัด เบอร์ 3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.22.2 ใบมีดผ่าตัด เบอร์ 10 และ 11

1.22.3 ปากคีบ (forceps)

1.22.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.22.5 แผ่นพลาสติกขนาด 70 × 90 มม

1.22.6 หลอดทดลองใส่แอลกอฮอล์

1.23 วัสดุที่ใช้ศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

1.23.1 เครื่องตัดล้อหมุน (rotary microtome)

1.23.2 เครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer)

1.23.3 ตู้อบ (hot air oven)

1.23.4 สไลด์และกระจกปิดสไลด์

1.23.5 ขวดแก้วใส่เนื้อเยื่อ (vial) ขนาด 35 ออนซ์

1.23.6 ขวดแก้วสำหรับย้อมสี (stainning jar)

1.23.7 เข็มเขี่ย

1.23.8 แท่งไม้สำหรับยึดเนื้อเยื่อที่ฝังพาราฟิน

1.24 วัสดุอื่น ๆ เช่น ยางรัด แผ่นป้ายเขียนกรรมวิธีและวันที่ทดลอง

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับทำความสะอาด และฆ่าเชื้อ

2.1.1 เอทิลแอลกอฮอล์ เข้มข้น 70 %

2.1.2 คลอรอกซ์ (active ingredient : NaOCl 5.25 %)

2.1.3 สารลดแรงตึงผิว tween 80

2.2 สารสำหรับเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง

2.2.1 เกลือให้ธาตุอาหารหลักตามสูตร Vacin and Went (1949) ดัดแปลง (ตาราง 1)

2.2.2 เกลือให้ธาตุอาหารรองตามสูตร Murashige and Skoog (1962) (ตาราง 2)

2.2.3 อินทรีย์สารตามสูตร MS (1962) (ตาราง 3)

2.2.4 Ferrous sulphate ของบริษัท J.T. Baker Chemical Co., Philipsburg New Jersey, USA.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.5 Disodium ethylene diaminetetraacetate ของบริษัท Koch-Light Laboratories Ltd., England

2.2.6 สารควบคุมการเจริญของพืช

2.2.6.1 Naphthalene acetic acid (NAA) ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA.

2.2.6.2 Benzyladenine (BA) ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA.

2.2.7 Potassium hydroxide 1 N

2.2.8 Hydrochloric acid 1 N

2.2.9 น้ำกลั่นชนิดกลั่นจากเครื่องแก้ว

2.2.10 กล้วยหอมสุก

2.2.11 มันฝรั่ง

2.2.12 น้ำมะพร้าว

2.2.13 ถ่านกัมมันต์

2.2.14 ผงวุ้น ตราเฮลิคอปเตอร์

2.3 สารที่ใช้สำหรับการศึกษาเนื้อเยื่อวิทยา

2.3.1 น้ำยาสำหรับฆ่าและรักษาสภาพเซลล์ (killing and fixing solution) ได้แก่ FAA

2.3.2 น้ำยาสำหรับดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydartion solution) ประกอบด้วย ethyl alcohol, tertiary butyl alcohol (TBA) และน้ำกลั่นในอัตราส่วนที่ต่างกันตั้งแต่ระดับ 50 % จนถึง 100 % ของ TBA

2.3.3 สารตัวกลางที่ใช้ในการฝังเนื้อเยื่อเพื่อการตัด (embedding media) ได้แก่ paraplast

2.3.4 น้ำยายึดเนื้อเยื่อพืชให้ติดแผ่นสไลด์ (adhesive)

2.3.5 น้ำยาทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing reagent)ได้แก่ xylene

2.3.6 สีสังเคราะห์สำหรับย้อมเนื้อเยื่อคือ hematoxylin

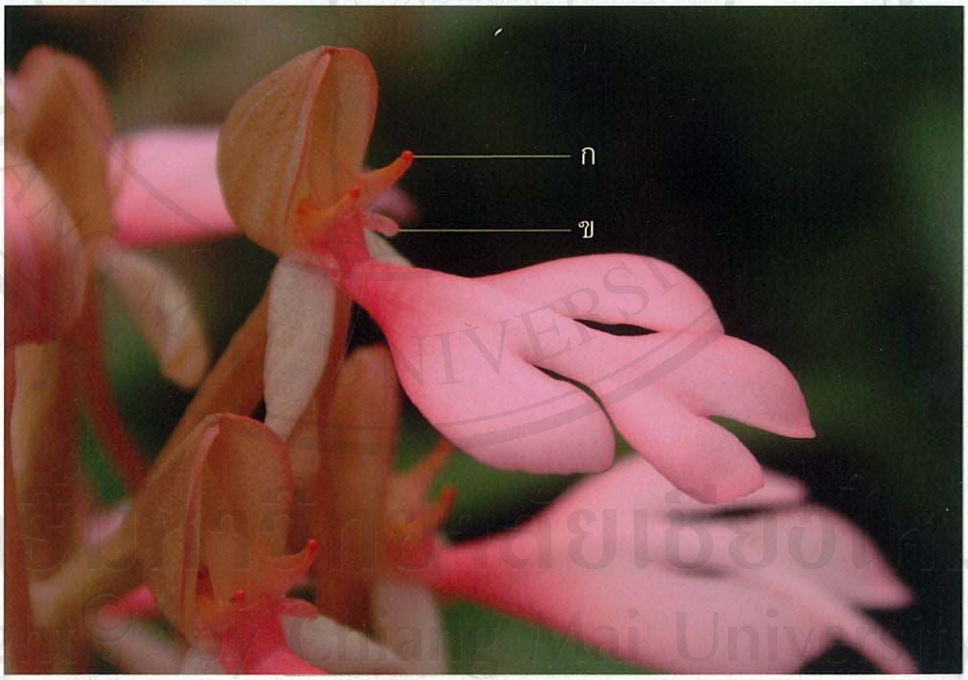
2.3.7 สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นสไลด์ (mounting media) ได้แก่ canada balsum

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การเตรียมวัสดุพันธุ์พืชส่วนที่ใช้ทดลอง

3.1 การผสมเกสร

การผสมเกสรทำโดย เลือกดอกที่สมบูรณ์ ดอกที่ 1 และ 2 ของช่อดอก ซึ่งกลีบดอกบานเต็มที่ (ภาพ 3) และเกสรตัวผู้อยู่ในระยะที่มีสีเหลืองสดใส ใช้ปลายไม้จิ้มฟันที่สะอาดแตะก้อนเกสรตัวผู้ครั้งละก้อน แล้วนำไปติดที่ติ่งเกสรตัวเมีย ซึ่งมีลักษณะเป็นงวงเล็ก ๆ ยื่นออกจากเส้าเกสร (ภาพ 4)

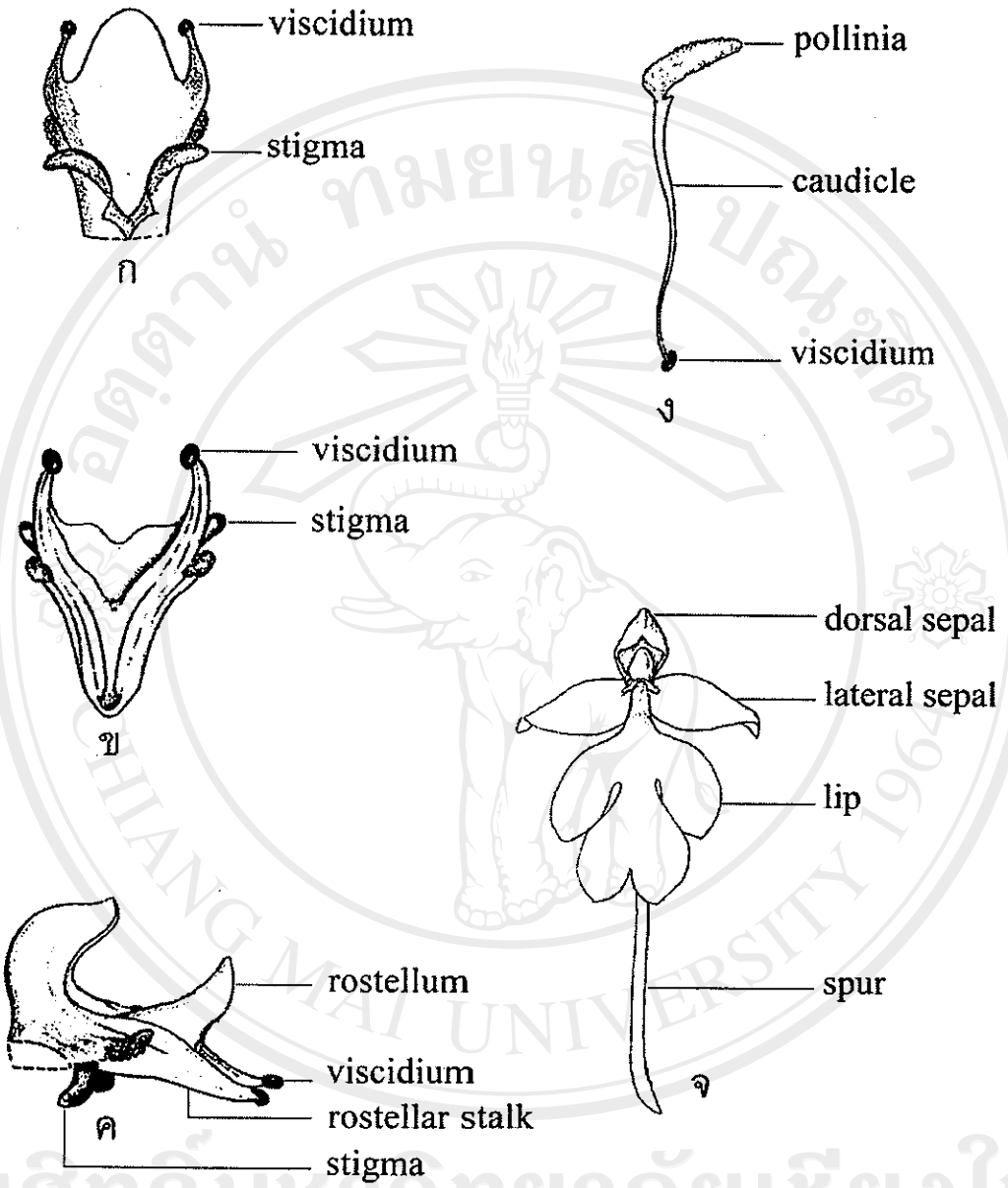


ภาพ 3 ดอกกล้วยไม้ดินลิ้นมังกร

ก ช่องเกสรตัวผู้

ข ติ่งเกสรตัวเมีย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 4 ส่วนประกอบของดอกกล้วยไม้ดินลิ้นมังกร

ก เส้าเกสรด้านล่าง

ข เส้าเกสรด้านบน

ค เส้าเกสรด้านข้าง

ง เกสรตัวผู้

จ ดอก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 การดูแลต้นกล้วยไม้หลังการผสมเกสร

รดน้ำเป็นประจำทุกเช้า วันละครั้ง และใส่ปุ๋ยเคมีทวินเฟอร์ตี้สูตร 10-52-17 ปริมาตร 4 ช้อนโต๊ะ ต่อน้ำ 20 ลิตร โดยฉีดพ่นให้ทางใบเป็นประจำ สัปดาห์ละครั้ง ฉีดพ่นยาป้องกันเชื้อรา เป็นครั้งคราว

3.3 การเพาะเมล็ดกล้วยไม้

3.3.1 นำฝักกล้วยไม้ที่มีอายุครบตามที่กำหนดในแต่ละการทดลอง มาทำความสะอาดเบื้องต้น โดยการฟอกล้างที่ผิวฝักด้วยน้ำยาไลปอนเอฟและล้างน้ำให้สะอาด

3.3.2 ตัดแต่งปลายฝักส่วนที่เป็นสีน้ำตาลออก แล้วใช้สำลีชุบเอทิลแอลกอฮอล์ 70 % เช็ดฝัก

3.3.3 นำฝักไปเขย่าในคลอรอกซ์ 15 % นาน 15 นาที นำเข้าตู้กรองอากาศ เมื่อครบเวลาล้างฝักด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

3.3.4 ใช้ปากคีบ คีบฝักนำไปวางบนจานเพาะเชื้อที่มีแผ่นพลาสติกที่ฆ่าเชื้อแล้วรองอยู่ ใช้มีดกรีดผ่าฝักออกตามแนวยาว โดยกรีดระหว่างรอยตะเข็บของฝัก จากนั้นใช้มีดเขี่ยเมล็ดจากแต่ละฝักลงในขวดเพาะแต่ละขวดซึ่งมีอาหารเหลวบรรจุอยู่ ปิดปากขวดด้วยแผ่นพลาสติกที่ฆ่าเชื้อแล้ว และใช้ยางรัด

3.3.5 นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ให้ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส

4. การเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution)

4.1 การเตรียมธาตุอาหารหลัก

เตรียมธาตุอาหารหลักสูตร Vacin and Went (VW, 1949) ดัดแปลง หรือ CMU1 โดยเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้นรวมกันให้มีความเข้มข้นของสารมากกว่าสูตรมาตรฐาน 20 เท่า และเตรียมให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล โดยใช้ปริมาณสารเคมีแต่ละชนิดตามตาราง 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร VW (1949) ดัดแปลง

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร VW ดัดแปลง (CMU1) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาความเข้มข้น 20X (ก/ล)
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	151	3.02
KH_2PO_4	250	5.00
KNO_3	525	10.50
$MgSO_4.7H_2O$	250	5.00
$(NH_4)_2SO_4$	500	10.00

4.2 การเตรียมธาตุอาหารรอง

เตรียมธาตุอาหารรองสูตร MS (1962) โดยเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้นรวมกันให้มีความเข้มข้นของสารมากกว่าสูตรมาตรฐาน 100 เท่า และเตรียมให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล โดยใช้ปริมาณสารเคมีแต่ละชนิดตามตาราง 2

ตาราง 2 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรองสูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาเข้มข้น 100X (มก/ล)
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	2.5
KI	0.83	83.0
$ZnSO_4.7H_2O$	8.60	860.0
$MnSO_4.4H_2O$	22.30	2,230.0
H_3BO_4	6.20	620.0
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	25.0
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	2.5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3 การเตรียมสารอินทรีย์

การเตรียมสารอินทรีย์สูตร MS (1962) โดยเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้นรวมกันให้มีความเข้มข้นของสารมากกว่าสูตรมาตรฐาน 100 เท่า และเตรียมให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล โดยใช้ปริมาณสารเคมีแต่ละชนิดตามตาราง 3

ตาราง 3 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของสารอินทรีย์สูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาเข้มข้น 100X (มก/ล)
Glycine	2.00	200
Thiamine .HCl	0.25	25
Pyridoxine .HCl	0.25	25
Nicotinic acid	0.25	25
Myo-inositol	100.00	10,000

4.4 การเตรียมสารละลายเหล็กในรูป $FeNa_2EDTA$

เตรียม $FeNa_2EDTA$ ในสูตร MS (1962) ซึ่งประกอบด้วย $FeSO_4.7H_20$ และ $Na_2EDTA.2H_2O$ โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมกัน ให้มีความเข้มข้นของสารมากกว่าในสูตรมาตรฐาน 100 เท่า เตรียมโดยชั่งสารแต่ละชนิดละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายของแต่ละสารเป็น 500 มล แล้วจึงนำมาผสมไว้ในขวดเดียวกัน โดยใช่ขวดสีชา เพื่อป้องกันแสง ตามตาราง 4

ตาราง 4 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของเหล็กสูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาเข้มข้น 100X (ก/ล)
$FeSO_4.7H_2O$	27.8	2.78
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.3	3.73

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.5 การเตรียมสารกระตุ้นการเจริญเติบโต

4.5.1 เตรียม NAA

ชั่ง NAA 1 มก ละลายด้วย absolute ethanol เล็กน้อยแล้วปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มก ด้วยน้ำกลั่น

4.5.2 การเตรียม BA

ชั่ง BA 1 มก ละลายด้วย 1N KOH เล็กน้อย แล้วปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น

5 วิธีวิจัย

การศึกษาแบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลองคือ

การทดลองที่ 1 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ดินลิ้นมังกร

แบ่งการศึกษาออกเป็น 5 การทดลองย่อยคือ

การทดลองที่ 1.1 ผลของอายุฝักต่อการงอกของเมล็ด

1.1.1 วัสดุทดลอง

เมล็ดกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรจากฝักอายุต่าง ๆ กัน

1.1.2 วิธีการทดลอง

นำเมล็ดกล้วยไม้จากฝักอายุ 3 4 5 6 และ 7 สัปดาห์หลังการผสมเกสรมาเพาะในอาหารเหลวสูตร VW (1949) ดัดแปลง ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ฝักอายุ 3 สัปดาห์

กรรมวิธีที่ 2 ฝักอายุ 4 สัปดาห์

กรรมวิธีที่ 3 ฝักอายุ 5 สัปดาห์

กรรมวิธีที่ 4 ฝักอายุ 6 สัปดาห์

กรรมวิธีที่ 5 ฝักอายุ 7 สัปดาห์

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) รวม 5 กรรมวิธี โดยเพาะ 1 ฝัก/ขวด ทำการทดลองกรรมวิธีละ 10 ซ้ำ แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ไม่ให้ได้รับแสง

1.1.3 การเตรียมอาหารเหลวสำหรับเพาะเมล็ด

การเตรียมอาหารสำหรับเพาะเมล็ดปริมาตร 1000 มล ดังขั้นตอนต่อไปนี้

1.1.3.1 เติมน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มล ประมาณ 200 มล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1.3.2 เติมสารละลายเข้มข้น (20X) ของธาตุอาหารหลักสูตร VW (1949) ดัดแปลง ปริมาตร 50 มล

1.1.3.3 เติมสารละลายเข้มข้น (100 X) ของธาตุอาหารรอง สูตร MS (1962) ปริมาตร 10 มล

1.1.3.4 เติมสารละลายเข้มข้น (100 X) ของสารอินทรีย์ สูตร MS (1962) ปริมาตร 10 มล

1.1.3.5 เติมสารละลายเข้มข้น (100 X) ของ $FeNa_2EDTA$ สูตร MS (1962) ปริมาตร 10 มล

1.1.3.6 เติมน้ำมะพร้าว ปริมาตร 150 มล

1.1.3.7 เติมน้ำตาล 20 ก

1.1.3.8 ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล ด้วยน้ำกลั่น

1.1.3.9 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเหลวให้เป็น 5.7

1.1.3.10 บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 50 มล ขวดละ 10 มล ปิดด้วยแผ่นพลาสติกทนร้อน ใช้ยางรัด นำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอที่ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว (ป/ตร น) เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้จนเย็นก่อนนำไปใช้

1.1.4 การบันทึกผลการทดลอง

1.1.4.1 วัดความกว้าง ความยาวของคัพภะ และโปรโตคอร์ม โดยการสุ่มวัด 1 เมล็ดต่อซ้ำ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ส่องกลับ

1.1.4.2 ระยะเวลาที่ใช้ในการงอก และเปอร์เซ็นต์การงอก (การงอกนับจากการที่คัพภะหลุดออกจากเปลือกหุ้มเมล็ดแล้ว)

การทดลองที่ 1.2 ผลของตำแหน่งฝักบนช่อดอกและอายุฝักที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ด

1.2.1 อุปกรณ์การทดลอง

เมล็ดกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรจากฝักอายุต่าง ๆ กัน

1.2.2 วิธีการทดลอง

นำเมล็ดกล้วยไม้จากฝักอายุ 3, 4 และ 5 สัปดาห์หลังการผสมเกสร ร่วมกับตำแหน่งบนช่อดอกคือ ตำแหน่งที่ 1 3 และ 5 โดยนับจากโคนต้น มาเพาะในอาหารเหลว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สูตร VW (1949) ดัดแปลง เพื่อดูว่าฝักอายุอ่อนในตำแหน่งที่ต่างกันจะมีอิทธิพลต่อการงอกอย่างไร ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ฝักอายุ 3 สัปดาห์ ตำแหน่งฝักที่ 1 (นับจากโคนช่อดอก)
กรรมวิธีที่ 2 ฝักอายุ 3 สัปดาห์ ตำแหน่งฝักที่ 3
กรรมวิธีที่ 3 ฝักอายุ 3 สัปดาห์ ตำแหน่งฝักที่ 5
กรรมวิธีที่ 4 ฝักอายุ 4 สัปดาห์ ตำแหน่งฝักที่ 1
กรรมวิธีที่ 5 ฝักอายุ 4 สัปดาห์ ตำแหน่งฝักที่ 3
กรรมวิธีที่ 6 ฝักอายุ 4 สัปดาห์ ตำแหน่งฝักที่ 5
กรรมวิธีที่ 7 ฝักอายุ 5 สัปดาห์ ตำแหน่งฝักที่ 1
กรรมวิธีที่ 8 ฝักอายุ 5 สัปดาห์ ตำแหน่งฝักที่ 3
กรรมวิธีที่ 9 ฝักอายุ 5 สัปดาห์ ตำแหน่งฝักที่ 5

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) รวม 9 กรรมวิธี โดยเพาะ 1 ฝัก/ขวด ทำการทดลองกรรมวิธีละ 10 ซ้ำ แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ไม่ให้ได้รับแสง

1.2.3 การเตรียมอาหารเพาะเมล็ด

เตรียมอาหารเหลวสำหรับเพาะเมล็ดโดยปฏิบัติตามขั้นตอนในการทดลองที่ 1 .1 ข้อ 1.1.3

1.2.4 การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกผลการทดลองเช่นเดียวกับ การทดลองที่ 1.1 ข้อ 1.1.4.1 และ 1.1.4.2

การทดลองที่ 1.3 ผลของอุณหภูมิและแสงต่อการงอกของเมล็ด

1.3.1 วัสดุทดลอง

เมล็ดกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรจากฝักอายุ 7 สัปดาห์ นำมาเพาะในอาหารเหลวสูตร VW (1949) ดัดแปลง ปริมาตร 10 มล ตามการทดลองที่ 1.1 จำนวน 10 ฝัก โดยเพาะ 1 ฝัก/ขวด เป็นเวลานาน 1 สัปดาห์ หลังจากนั้น นำเมล็ดมารวมกัน แล้วปรับปริมาตรอาหารเป็น 20 มล

1.3.2 วิธีการทดลอง

นำเมล็ดกล้วยไม้จากข้อ 1.3.1 เขย่าให้เข้ากันเบา ๆ ใช้หลอดหยดดูดเมล็ดแล้วนำมาหยดบนอาหารวุ้นสูตร VW (1949) ดัดแปลง ขวดละ 3 หยด (เนื่องจากเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวตลอดเวลาพบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์มากกว่า) แล้วนำมาเลี้ยงให้ได้รับอุณหภูมิต่างกัน 3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ระดับ คือ 20 25 และ 30 องศาเซลเซียส ร่วมกับ การได้รับแสง โดยมีความเข้มแสงประมาณ 30 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที และไม่ได้รับแสง ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และ ได้รับแสง
กรรมวิธีที่ 2 อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และ ไม่ได้รับแสง
กรรมวิธีที่ 3 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ ได้รับแสง
กรรมวิธีที่ 4 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ ไม่ได้รับแสง
กรรมวิธีที่ 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ ได้รับแสง
กรรมวิธีที่ 6 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ ไม่ได้รับแสง

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) รวม 6 กรรมวิธี ทำการทดลองกรรมวิธีละ 5 ซ้ำ

1.3.3 การเตรียมอาหารเพาะเมล็ด

การเตรียมอาหารวุ้นสำหรับเพาะเมล็ด สูตร VW (1949) ดัดแปลง ตามขั้นตอนในการทดลองที่ 1.1 ข้อ 1.1.3 แต่เติมวุ้น 0.8 % (ปริมาตร/น้ำหนัก)

1.3.4 การบันทึกผล

1.3.4.1 วัดความกว้าง ความยาวของคัพภะ และโปรโตคอร์ม โดยการสุ่มวัด 5 ตัวอย่างต่อซ้ำ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ส่องกลับ

1.3.4.2 ระยะเวลาที่ใช้ในการงอก และเปอร์เซ็นต์การงอก

การทดลองที่ 1.4 ผลของระดับน้ำตาลต่อการงอกของเมล็ด

1.4.1 วัสดุทดลอง

เมล็ดกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรจากฝักอายุ 7 สัปดาห์ นำมาเพาะในอาหารเหลว สูตร VW (1949) ดัดแปลง ปริมาตร 10 มล ตามการทดลองที่ 1.1 (ไม่ใส่น้ำตาล) จำนวน 10 ฝัก โดยเพาะ 1 ฝัก/ขวด เป็นเวลานาน 1 สัปดาห์ หลังจากนั้น นำเมล็ดมารวมกัน แล้วปรับปริมาตรอาหารเป็น 20 มล

1.4.2 วิธีการทดลอง

นำเมล็ดกล้วยไม้จากข้อ 1.4.1 เพาะบนอาหารวุ้นสูตร VW (1949) ดัดแปลง ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 6 ระดับ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เติมน้ำตาล 0 %
กรรมวิธีที่ 2 เติมน้ำตาล 2 %
กรรมวิธีที่ 3 เติมน้ำตาล 4 %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 4 เติมน้ำตาล 6 %

กรรมวิธีที่ 5 เติมน้ำตาล 8 %

กรรมวิธีที่ 6 เติมน้ำตาล 10 %

เขย่าเมล็ดให้เข้ากันเบา ๆ ใช้หลอดหยดดูดเมล็ด แล้วนำมาหยดขวดละ 3 หยด วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) รวม 6 กรรมวิธี ทำการทดลองกรรมวิธีละ 5 ซ้ำ นำไปเลี้ยงโดยไม่ให้ได้รับแสง

1.4.3 วิธีการเตรียมอาหารเพาะเมล็ด

เตรียมอาหารวุ้นสำหรับเพาะเมล็ดกรรมวิธีละ 100 มล ตามขั้นตอนในการทดลองที่ 1.3 ข้อ 1.3.3

ปรับระดับน้ำตาลซูโครสในกรรมวิธีต่าง ๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เติมน้ำตาล 0 ก

กรรมวิธีที่ 2 เติมน้ำตาล 2 ก

กรรมวิธีที่ 3 เติมน้ำตาล 4 ก

กรรมวิธีที่ 4 เติมน้ำตาล 6 ก

กรรมวิธีที่ 5 เติมน้ำตาล 8 ก

กรรมวิธีที่ 6 เติมน้ำตาล 10 ก

1.4.4 การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกผลการทดลองเช่นเดียวกับ การทดลองที่ 1.3

การทดลองที่ 1.5 ผลของ NAA และ BA ต่อการงอกของเมล็ด

1.5.1 วัสดุทดลอง

เมล็ดกล้วยไม้ดินลิ้นมังกรจากฝักอายุ 7 สัปดาห์ นำมาเพาะในอาหารเหลวสูตร VW (1949) ดัดแปลง ที่ไม่มี NAA และ BA ปริมาตร 10 มล ตามการทดลองที่ 1.1 จำนวน 10 ฝัก โดยเพาะ 1 ฝัก/ขวด เป็นเวลานาน 1 สัปดาห์ หลังจากนั้น นำเมล็ดมารวมกัน แล้วปรับปริมาตรอาหารเป็น 20 มล

1.5.2 วิธีการทดลอง

นำเมล็ดกล้วยไม้จากข้อ 1.5.1 เพาะบนอาหารวุ้นสูตร VW (1949) ดัดแปลง ที่มีความเข้มข้น NAA 3 ระดับ คือ 0 0.1 และ 1.0 มล/ล ร่วมกับ BA 3 ระดับ คือ 0 0.1 และ 1.0 มล/ล ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 1 เติม NAA 0 มล/ล BA 0 มล/ล
กรรมวิธีที่ 2 เติม NAA 0.1 มล/ล BA 0 มล/ล
กรรมวิธีที่ 3 เติม NAA 1.0 มล/ล BA 0 มล/ล
กรรมวิธีที่ 4 เติม NAA 0 มล/ล BA 0.1 มล/ล
กรรมวิธีที่ 5 เติม NAA 0.1 มล/ล BA 0.1 มล/ล
กรรมวิธีที่ 6 เติม NAA 1.0 มล/ล BA 0.1 มล/ล
กรรมวิธีที่ 7 เติม NAA 0 มล/ล BA 1.0 มล/ล
กรรมวิธีที่ 8 เติม NAA 0.1 มล/ล BA 1.0 มล/ล
กรรมวิธีที่ 9 เติม NAA 1.0 มล/ล BA 1.0 มล/ล

โดยเขย่าเมล็ดให้เข้ากันเบา ๆ ใช้หลอดหยดดูดเมล็ด แล้วนำมาหยดขวดละ 3 หยด วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) รวม 9 กรรมวิธี ทำการทดลองกรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ไม่ให้ได้รับแสง

1.5.3 การเตรียมอาหาร

เตรียมอาหารวุ้นสำหรับเพาะเมล็ดกรรมวิธีละ 100 มลโดยปฏิบัติตามขั้นตอนในการทดลองที่ 1.3 ข้อ 1.3.3 ดัดแปลงโดยการเติม NAA (1 มล/100 มล) และ BA (1 มล/100 มล) ที่ระดับต่าง ๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เติม NAA 0 มล BA 0 มล
กรรมวิธีที่ 2 เติม NAA 0.5 มล BA 0 มล
กรรมวิธีที่ 3 เติม NAA 5.0 มล BA 0 มล
กรรมวิธีที่ 4 เติม NAA 0 มล BA 0.5 มล
กรรมวิธีที่ 5 เติม NAA 0. 5 มล BA 0.5 มล
กรรมวิธีที่ 6 เติม NAA 5.0 มล BA 0.5 มล
กรรมวิธีที่ 7 เติม NAA 0 มล BA 5.0 มล
กรรมวิธีที่ 8 เติม NAA 0.5 มล BA 5.0 มล
กรรมวิธีที่ 9 เติม NAA 5.0 มล BA 5.0 มล

1.5.4 การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกผลการทดลองเช่นเดียวกับ การทดลองที่ 1.3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม การเจริญเติบโตของต้นและหัวของกล้วยไม้ดินลิ้นมังกร

แบ่งการศึกษาออกเป็น 3 การทดลองย่อยคือ

การทดลองที่ 2.1 การเปรียบเทียบความต้องการแสงและอุณหภูมิที่มีผลต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม

2.1.1 วัสดุทดลอง

โปรโตคอร์มขนาด 1-2 มม ที่ได้จากการเพาะเมล็ดจากฝักอายุ 7 สัปดาห์ บนอาหารวุ้นสูตร VW (1949) ดัดแปลง

2.1.2 วิธีการทดลอง

นำโปรโตคอร์ม มาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร VW (1949) ดัดแปลง โดยให้ระยะเวลาในการได้รับแสงต่างกันคือ ให้ได้รับแสงทันทีหลังจากทำการเลี้ยงโปรโตคอร์ม ให้ได้รับแสงหลังจากเลี้ยงโปรโตคอร์มแล้ว 4 สัปดาห์ ให้ได้รับแสงหลังจากเลี้ยงโปรโตคอร์มแล้ว 8 สัปดาห์ โดยมีความเข้มแสงประมาณ 30 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที จากหลอดฟลูออเลสเซนต์ ตลอด 24 ชั่วโมง ร่วมกับการได้รับอุณหภูมิ 3 ระดับคือ 20 25 และ 30 องศาเซลเซียส ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ได้รับแสงทันทีหลังจากทำการเลี้ยงโปรโตคอร์ม และ อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 2 ได้รับแสงทันทีหลังจากทำการเลี้ยงโปรโตคอร์ม และ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 3 ได้รับแสงทันทีหลังจากทำการเลี้ยงโปรโตคอร์ม และ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 4 ได้รับแสงหลังจากเลี้ยงโปรโตคอร์มแล้ว 4 สัปดาห์ และ อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 5 ได้รับแสงหลังจากเลี้ยงโปรโตคอร์มแล้ว 4 สัปดาห์ และ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 6 ได้รับแสงหลังจากเลี้ยงโปรโตคอร์มแล้ว 4 สัปดาห์ และ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 7 ได้รับแสงหลังจากเลี้ยงโปรโตคอร์มแล้ว 8 สัปดาห์ และ อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 8 ได้รับแสงหลังจากเลี้ยงโปรโตคอร์มแล้ว 8 สัปดาห์ และ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 9 ได้รับแสงหลังจากเลี้ยงโปรโตคอร์มแล้ว 8 สัปดาห์ และ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) รวม9 กรรมวิธี ทำการทดลองกรรมวิธีละ 10 ซ้ำ โดยเลี้ยง 1 โปรโตคอร์มต่อหลอด

2.1.3 การเตรียมอาหาร

เตรียมอาหารวุ้นกรรมวิธีละ 100 มลโดยปฏิบัติตามขั้นตอนในการทดลองที่ 1.3 ข้อ 1.3.3 ใช้อาหารหลอดละ 10 มล

2.1.4 การบันทึกผลการทดลอง

2.1.4.1 บันทึกความมีชีวิตรอดและคุณภาพของโปรโตคอร์ม

2.1.4.2 ระยะเวลาที่โปรโตคอร์มเริ่มมียอด และใบ

2.1.4.3 วัดความกว้าง ความยาวใบ และจำนวนใบ/ต้น

2.1.4.4 วัดความกว้าง ความยาวราก และจำนวนราก/ต้น

2.1.4.5 วัดความกว้าง ความยาวหัว จำนวนหัว/ต้น

การทดลองที่ 2.2 การเปรียบเทียบระดับน้ำตาลและกล้วยบดที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นและหัว

2.2.1 วัสดุทดลอง

ต้นอ่อนขนาดความสูง 5 ± 2 มม ที่ได้จากการเพาะเมล็ดจากฝักอายุ 7 สัปดาห์หลังการผสมเกสร บนอาหารสูตร VW (1949) ดัดแปลง

2.2.2 วิธีการทดลอง

นำต้นอ่อนมาเลี้ยงบนอาหารสูตร VW (1949) ดัดแปลง ที่เติมถ่านกัมมันต์ 0.2 % โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 4 ระดับคือ 0 2 4 และ 8 % ร่วมกับความเข้มข้นของกล้วยบด 3 ระดับ คือ 0, 25 และ 50 ก/ล ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เติม น้ำตาล 0 % และ กล้วยบด 0 ก/ล

กรรมวิธีที่ 2 เติม น้ำตาล 0 % และ กล้วยบด 25 ก/ล

กรรมวิธีที่ 3 เติม น้ำตาล 0 % และ กล้วยบด 50 ก/ล

กรรมวิธีที่ 4 เติม น้ำตาล 2 % และ กล้วยบด 0 ก/ล

กรรมวิธีที่ 5 เติม น้ำตาล 2 % และ กล้วยบด 25 ก/ล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 6 เติม น้ำตาล 2 % และ กล้วยบด 50 ก/ล
กรรมวิธีที่ 7 เติม น้ำตาล 4 % และ กล้วยบด 0 ก/ล
กรรมวิธีที่ 8 เติม น้ำตาล 4 % และ กล้วยบด 25 ก/ล
กรรมวิธีที่ 9 เติม น้ำตาล 4 % และ กล้วยบด 50 ก/ล
กรรมวิธีที่ 10 เติม น้ำตาล 8 % และ กล้วยบด 0 ก/ล
กรรมวิธีที่ 11 เติม น้ำตาล 8 % และ กล้วยบด 25 ก/ล
กรรมวิธีที่ 12 เติม น้ำตาล 8 % และ กล้วยบด 50 ก/ล

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) รวม 12 กรรมวิธี ทำการทดลองกรรมวิธีละ 10 ซ้ำ โดยเลี้ยงต้นอ่อน 1 ต้นต่อหลอด ได้รับความเข้มแสงประมาณ 30 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที จากหลอดฟลูออเลสเซนต์ ตลอด 24 ชั่วโมง

2.2.3 การเตรียมอาหาร

เตรียมอาหารวุ้นสำหรับเลี้ยงต้นอ่อนสูตร VW (1949) ดัดแปลง โดยปฏิบัติตามขั้นตอนในการทดลองที่ 2.1 ข้อ 2.1.3 ดัดแปลงโดยการเติม ถ่านกัมมันต์ 0.2 % และปรับระดับน้ำตาลซูโครสและกล้วยบด ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เติม น้ำตาล 0 ก และ กล้วยบด 0 ก
กรรมวิธีที่ 2 เติม น้ำตาล 0 ก และ กล้วยบด 2.5 ก
กรรมวิธีที่ 3 เติม น้ำตาล 0 ก และ กล้วยบด 5 ก
กรรมวิธีที่ 4 เติม น้ำตาล 2 ก และ กล้วยบด 0 ก
กรรมวิธีที่ 5 เติม น้ำตาล 2 ก และ กล้วยบด 2.5 ก
กรรมวิธีที่ 6 เติม น้ำตาล 2 ก และ กล้วยบด 5 ก
กรรมวิธีที่ 7 เติม น้ำตาล 4 ก และ กล้วยบด 0 ก
กรรมวิธีที่ 8 เติม น้ำตาล 4 ก และ กล้วยบด 2.5 ก
กรรมวิธีที่ 9 เติม น้ำตาล 4 ก และ กล้วยบด 5 ก
กรรมวิธีที่ 10 เติม น้ำตาล 8 ก และ กล้วยบด 0 ก
กรรมวิธีที่ 11 เติม น้ำตาล 8 ก และ กล้วยบด 2.5 ก
กรรมวิธีที่ 12 เติม น้ำตาล 8 ก และ กล้วยบด 5 ก

2.2.4 การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกผลการทดลองเช่นเดียวกับ การทดลองที่ 2.1 ข้อที่ 2.1.4.3 ถึงข้อ 2.1.4.5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2.3 การเปรียบเทียบระดับน้ำตาลและน้ำสกัดมันฝรั่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นและหัว

2.3.1 วัสดุทดลอง

ต้นอ่อนขนาดความสูง 5 ± 2 มม ที่ได้จากการเพาะเมล็ดจากฝักอายุ 7 สัปดาห์หลังการผสมเกสร บนอาหารสูตร VW (1949) ดัดแปลง

2.3.2 วิธีการทดลอง

นำต้นอ่อนมาเลี้ยงบนอาหารสูตร VW (1949) ดัดแปลง ที่เติมถ่านกัมมันต์ 0.2 % โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 4 ระดับคือ 0 2 4 และ 8 % ร่วมกับความเข้มข้นน้ำสกัดมันฝรั่ง 3 ระดับ คือ 0 50 และ 100 ก/ล ดังนี้

กรรมวิธีที่	1	เติม น้ำตาล	0 % และ น้ำสกัดมันฝรั่ง	0	ก/ล
กรรมวิธีที่	2	เติม น้ำตาล	0 % และ น้ำสกัดมันฝรั่ง	50	ก/ล
กรรมวิธีที่	3	เติม น้ำตาล	0 % และ น้ำสกัดมันฝรั่ง	100	ก/ล
กรรมวิธีที่	4	เติม น้ำตาล	2 % และ น้ำสกัดมันฝรั่ง	0	ก/ล
กรรมวิธีที่	5	เติม น้ำตาล	2 % และ น้ำสกัดมันฝรั่ง	50	ก/ล
กรรมวิธีที่	6	เติม น้ำตาล	2 % และ น้ำสกัดมันฝรั่ง	100	ก/ล
กรรมวิธีที่	7	เติม น้ำตาล	4 % และ น้ำสกัดมันฝรั่ง	0	ก/ล
กรรมวิธีที่	8	เติม น้ำตาล	4 % และน้ำสกัดมันฝรั่ง	50	ก/ล
กรรมวิธีที่	9	เติม น้ำตาล	4 % และ น้ำสกัดมันฝรั่ง	100	ก/ล
กรรมวิธีที่	10	เติม น้ำตาล	8 % และ น้ำสกัดมันฝรั่ง	0	ก/ล
กรรมวิธีที่	11	เติม น้ำตาล	8 % และ น้ำสกัดมันฝรั่ง	50	ก/ล
กรรมวิธีที่	12	เติม น้ำตาล	8 % และ น้ำสกัดมันฝรั่ง	100	ก/ล

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) รวม 12 กรรมวิธี ทำการทดลองกรรมวิธีละ 10 ซ้ำ โดยเลี้ยงต้นอ่อน 1 ต้นต่อหลอด ได้รับความเข้มแสงประมาณ 30 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที จากหลอดฟลูออเลสเซนต์ ตลอด 24 ชั่วโมง

2.3.3 วิธีการเตรียมอาหาร

2.3.3.1 การเตรียมน้ำสกัดมันฝรั่ง

ก น้ำสกัดมันฝรั่งที่ 50 ก/ล โดยนำมันฝรั่งที่ล้าง ปอกเปลือกแล้ว มาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 1 ลบ ซม น้ำหนัก 50 ก มาต้มในน้ำ 1,000 มล ให้เหลือ 500 มล ตักมันฝรั่งออกให้เหลือแต่น้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข น้ำสกัดมันฝรั่งที่ 100 ก/ล โดยนำมันฝรั่งที่ล้าง ปอกเปลือก แล้วมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 1 ลบ ซม น้ำหนัก 100 ก มาต้มในน้ำ 1,000 มล ให้เหลือ 500 มล ตักมันฝรั่งออกให้เหลือแต่น้ำ

2.3.3.2 การเตรียมอาหารวุ้นสำหรับเลี้ยงต้นอ่อนใช้สูตร VW (1949) ดัดแปลง โดยปฏิบัติตามขั้นตอนในการทดลองที่ 2.1 ข้อ 2.1.3 ดัดแปลงโดยการเติม ถ่านกัมมันต์ 0.2 % โดยใช้น้ำตาลซูโครสและน้ำสกัดมันฝรั่งที่ระดับต่าง ๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่	1	เติม น้ำตาล	0 ก และ น้ำสกัดมันฝรั่ง	0 มล
กรรมวิธีที่	2	เติม น้ำตาล	0 ก และ น้ำสกัดมันฝรั่ง (จากข้อ 2.3.3.1 ก)	50 มล
กรรมวิธีที่	3	เติม น้ำตาล	0 ก และ น้ำสกัดมันฝรั่ง (จากข้อ 2.3.3.1 ข)	50 มล
กรรมวิธีที่	4	เติม น้ำตาล	2 ก และ น้ำสกัดมันฝรั่ง	0 มล
กรรมวิธีที่	5	เติม น้ำตาล	2 ก และ น้ำสกัดมันฝรั่ง (จากข้อ 2.3.3.1 ก)	50 มล
กรรมวิธีที่	6	เติม น้ำตาล	2 ก และ น้ำสกัดมันฝรั่ง (จากข้อ 2.3.3.1 ข)	50 มล
กรรมวิธีที่	7	เติม น้ำตาล	4 ก และ น้ำสกัดมันฝรั่ง	0 มล
กรรมวิธีที่	8	เติม น้ำตาล	4 ก และ น้ำสกัดมันฝรั่ง (จากข้อ 2.3.3.1 ก)	50 มล
กรรมวิธีที่	9	เติม น้ำตาล	4 ก และ น้ำสกัดมันฝรั่ง (จากข้อ 2.3.3.1 ข)	50 มล
กรรมวิธีที่	10	เติม น้ำตาล	8 ก และ น้ำสกัดมันฝรั่ง	0 มล
กรรมวิธีที่	11	เติม น้ำตาล	8 ก และ น้ำสกัดมันฝรั่ง (จากข้อ 2.3.3.1 ก)	50 มล
กรรมวิธีที่	12	เติม น้ำตาล	8 ก และ น้ำสกัดมันฝรั่ง (จากข้อ 2.3.3.1 ข)	50 มล

2.3.4 การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกผลการทดลองเช่นเดียวกับ การทดลองที่ 2.1 ข้อที่ 2.1.4.3 ถึงข้อ 2.1.4.5

6. ศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

โดยใช้เทคนิคการศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาโดย ทำการตัดเนื้อเยื่อให้มีขนาด 10 ไมโครเมตร ใช้เครื่องตัดเนื้อเยื่อชนิด rotary microtome

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved