# บทที่ 3

## อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

**การทดลองที่ 1 ผลของวัสดุเพาะเมล็ดและไมคอร์ไรซาต่อปริมาณการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ดิน**

**1.1 วัสดุและอุปกรณ์ในการทดลอง**

1.1.1 วัสดุเพาะ ได้แก่

1. สแฟกนัมมอส
2. กระเช้าสีดาแห้ง
3. ใบก้ามปู
4. ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว

1.1.2 เมล็ดกล้วยไม้ดิน ได้แก่

1. เอื้องดินใบหมาก (*Spathoglottis plicata* Blume 'alba'.)
2. ลิ้นมังกรสีชมพู (*Habenaria erickmichaelii* Christenson)
3. เอื้องไผ่ (*Arundina graminifolia* (D.Don) Hochr.)

1.1.3 ไมคอร์ไรซา ได้แก่

1. เชื้อแอคติโนมัยซีท isolate DFR 001 ที่ได้จากรากกล้วยไม้เหลืองจันทบูรณ์ (*Dendrobium friedericksianum* Rchb.f.)
2. เชื้อรา isolate DAR 004 ที่ได้จากลำลูกกล้วยของกล้วยไม้สายน้ำผึ้ง (*Dendrobium primulinum* Lindl.)
3. เชื้อรา isolate DTR 001 ที่ได้จากใบของกล้วยไม้มอนไข่ (*Dendrobium thyrsiflorum* Rchb.f.)

1.1.4 ถุงพลาสติก และยางรัด

1.1.5 เครื่องหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)

1.1.6 เครื่องบด

1.1.7 เครื่องชั่งสารและเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง

1.1.8 ตู้อบ (hot air over)

1.1.9 จานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร

1.1.10 ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อและใส่เม็ดข้าวฟ่าง

1.1.11 กระบอกตวง (cylinder) ขนาด 100 และ 500 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1.12 บีกเกอร์ (beaker)

1.1.13 ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.1.14 ช้อนตักสาร (spatula)

1.1.15 ปากคีบ (forceps)

1.1.16 เข็มเขี่ย (needle)

1.1.17 พาราฟิล์ม

1.1.18 มีดผ่าตัด

1.1.19 ปากกาเขียนแก้ว

1.1.20 ไฟแช็ค

1.1.21 ตะกร้า

1.1.22 กล้องจุลทรรศ์แบบสเตอริโอ

1.1.23 เตาแก๊ส

1.1.24 เตาไมโครเวฟ

1.1.25 ตู้ถ่ายเชื้อ

1.1.26 ตู้บ่มเชื้อ

1.1.27 ที่คอคเชื้อ (cork borrer) เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1 เซนติเมตร

1.1.28 ไม้จิ้มฟัน

1.1.29 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)

1.1.30 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บเมล็ด

1. มีดผ่าตัด
2. ปากคีบ
3. ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.1.31 วัสดุที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. มันฝรั่ง
2. น้ำตาลเดกโตรส
3. ผงวุ้น (agar)
4. น้ำกลั่น

1.1.32 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1.1.32.1 สารที่ทำความสะอาดและฟอกฆ่าเชื้อ

1. คลอรอกซ์ (Clorox )

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. น้ำยาล้างจาน

3. เอทิลแอลกอฮอล์ 75 เปอร์เซ็นต์

1.1.32.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติของวัสดุเพาะ

1.1.32.2.1 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณอินทรียวัตถุ

1. โพแทสเซียมไดโครเมท ($K_2Cr_2O_7$)

2. กรดซัลฟูริก ($H_2SO_4$)

3. เฟอรัสซัลเฟต ($Fe_2SO_4$)

4. O-phenanthroline ferrous complex

1.1.32.2.2 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ธาตุไนโตรเจน

1. $H_2SO_4$

2. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ($H_2O$)

3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

4. เอทานอล ($C_2H_5OH$)

5. เมทิลเรด ($C_{15}H_{15}N_3O_2$)

6. โบรโมครีซอลกรีน ($C_{21}H_4Br_4O_5S$)

7.กรดบอริค ($H_3BO_3$)

8. กรดไฮโดรคลอริค (HCl)

9. ผงซีลีเนียม (Se)

10. ผงกรดไซลิไซลิคSalicylic acid powder ($HOC_6H_4COONa$)

1.1.32.2.3 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ธาตุฟอสฟอรัส

1. $H_2SO_4$

2. HCl

3. แอมโมเนียมโมลิบเดต ($(NH_4)6Mo_7O_{24}$)

4. แอมโมเนียมฟลูออไรด์ ($NH_4F$)

5. Potassium antimony (III) oxide tartrate hemihydrate ($C_4H_4O_6KO_7Sb.1/2H_2O$)

6. กรดแอสโครบิค ($C_4H_8O_6$)

7. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($KH_2PO_4$)

8. แอมโมเนียม metavanadate ($NH_4VO_3$)

9. กรดไนตริก ($HNO_3$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

10. กรดเปอร์คลอริค ($HClO_4$)

1.1.32.2.4 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ธาตุโพแทสเซียม

1. แอมโมเนียมอะซีเตต ($NH_4OAc$)

2. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)

3. $HNO_3$

4. $HClO_4$

1.1.32.2.5 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ธาตุแคลเซียมและแมกนีเซียม

1. แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)

2. $HClO_4$

3. $HNO_3$

4. $HClO_4$

5. แลนทานัมออกไซด์ ($LaO_3$)

6. สารละลายมาตรฐานของเหล็ก

**1.2. การเตรียมวัสดุพันธุ์พืชสำหรับการทดลอง**

**1.2.1 การผสมเกสร**

ทำการผสมเกสรกล้วยไม้ดิน 3 ชนิด คือ เอื้องดินใบหมาก (*Spathoglottis plicata* Blume 'alba'.) ลิ้นมังกรสีชมพู (*Habenaria erickmichaelii* Christenson) และเอื้องไผ่ (*Arundina graminifolia* (D.Don) Hochr.) โดยทำการควบคุมการผสมเกสรให้มีการผสมตัวเอง เมื่อฝักเอื้องดินใบหมากมีอายุ 27 วัน ฝักลิ้นมังกรสีชมพูมีอายุ 30 และฝักเอื้องไผ่มีอายุ 45 วัน เก็บฝักกล้วยไม้นำมาทำความสะอาดฟอกฆ่าเชื้อ แล้วใช้มีดผ่าตัดผ่าฝักกล้วยไม้ออก ใช้ปลายมีดเขี่ยเมล็ดกล้วยไม้ลงบนจานแก้วที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ปิดด้วยพาราฟิล์ม

**1.2.2 การเตรียมวัสดุเพาะ**

นำวัสดุเพาะ ได้แก่ สแฟกนัมมอส กระเช้าสีดาแห้ง ใบก้ามปู และปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว นำมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แล้วนำไปบดให้ละเอียด ยกเว้นปุ๋ยหมักขุยมะพร้าวไม่ต้องบด นำวัสดุเพาะที่บดละเอียดแล้วมาเพิ่มความชื้นให้เหมาะสำหรับเป็นวัสดุเพาะ โดยชั่งวัสดุเพาะ 100 กรัม ต่อน้ำ 200 มิลลิลิตร แล้วชั่งวัสดุเพาะที่เพิ่มความชื้นแล้วใส่ถุงพลาสติก ถุงละ 300 กรัม ใส่ถุง 2 ชั้น ใช้ยางรัดรัดปากถุง นำไปอบฆ่าเชื้อ โดยเครื่องหม้อนึ่งความดันที่แรงดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**1.2.3 การเตรียมไมคอร์ไรซา**

ไมคอร์ไรซาที่ใช้ศึกษามี 3 ชนิด คือ เชื้อแอคติโนมันซีท isolate DFR 001 ที่ได้จากรากกล้วยไม้เหลืองจันทบูรณ์ (*Dendrobium friedericksianum* Rchb.f.) เชื้อรา isolate DAR 004 ที่ได้จากลำลูกกล้วยของกล้วยไม้สายน้ำผึ้ง (*Dendrobium primulinum* Lindl.) และ เชื้อรา isolate DTR 001 ที่ได้จากใบของกล้วยไม้มอนไข่ (*Dendrobium thyrsiflorum* Rchb.f.) โดยเลี้ยงเชื้อแอคติโนมันซีท isolate DFR 001 ในอาหารสูตร Inhibitory Mold Agar (IMA-2) (ภาคผนวก ข) ส่วนเชื้อรา isolate DAR 004 และเชื้อรา isolate DTR 001 เลี้ยงในอาหารสูตร Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ข) เมื่อไมคอร์ไรซามีการขยายการเจริญจนเต็มภาชนะ ทำการเขี่ยไมคอร์ไรซาใส่ในขวดเมล็ดข้าวฟ่างที่นึ่งและอบฆ่าเชื้อแล้ว รอไมคอร์ไรซาขยายเต็มขวดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ นำไมคอร์ไรซาที่ขยายเต็มเมล็ดข้าวฟ่างใส่ในวัสดุเพาะที่เตรียมไว้ โดยชั่งเมล็ดข้าวฟ่างที่มีไมคอร์ไรซาเชื้อแอคติโนมันซีท isolate DFR 001 0.03 กรัม ส่วนเชื้อรา isolate DAR 004 และ isolate DTR 001 ชั่ง 3 กรัม หมักทิ้งไว้ 2 สัปดาห์ ในสภาพห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และควบคุมความชื้นของวัสดุเพาะที่ 60%

**1.3 วิธีการทดลอง**

**1.3.1 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีบางประการของวัสดุเพาะ**

ทำการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีบางประการของวัสดุเพาะที่คัดเลือกมาได้ เพื่อให้ทราบสมบัติทางเคมีก่อนนำวัสดุเพาะไปทดสอบร่วมกับไมคอร์ไรซา โดยทำการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH), ไนโตรเจนทั้งหมด (% Total N), ฟอสฟอรัสทั้งหมด (% $P_2O_5$), โพแทสเซียมทั้งหมด (% $K_2O$), แคลเซียมทั้งหมด (% Ca) และแมกนีเซียมทั้งหมด (% Mg) ของวัสดุเพาะทั้ง 4 ชนิด ซึ่งได้แก่ สแฟกนัมมอส กระเช้าสีดาแห้ง ใบก้ามปู และปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว วิธีวิเคราะห์มีรายละเอียดโดยย่อดังตารางที่ 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตารางที่ 1** วิธีวิเคราะห์สมบัติทางเคมีบางประการของวัสดุเพาะ (กรมวิชาการเกษตร, 2548)

| วิเคราะห์ | วิธีการ |
|---|---|
| pH | วัสดุเพาะ:น้ำ อัตราส่วน 1:10 วัดด้วยเครื่อง pH meter |
| EC | วัสดุเพาะ:น้ำ อัตราส่วน 1:10 วัดด้วยเครื่อง Conductivity meter |
| Total N | ชั่งตัวอย่างวัสดุเพาะประมาณ 0.20 กรัม ใช้ sulfuric acid เข้มข้นผสม salicylic acid ย่อยจนละลาย เติม sodiumthiosulphate และ catalyst mixture ย่อยต่อจนสารละลายใสแล้วนำไปกลั่นโดยใช้ boric acid เป็นตัวรับและ titrate ด้วย $H_2SO_4$ เข้มข้น 0.02 N |
| Total P | ชั่งตัวอย่างวัสดุเพาะประมาณ 0.50 กรัม เติม $HClO_4$ 10 มิลลิลิตร ย่อยที่อุณหภูมิ 240 องศาเซลเซียส จนใส กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 ดูดสารละลายที่ได้โดยให้เกิดปฏิกิริยากับmolybdovanadate วัดด้วยเครื่องUV-Spectrophotometer ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร |
| Total K | ชั่งตัวอย่างวัสดุเพาะประมาณ 0.50 กรัม เติม $HClO_4$ มิลลิลิตร ย่อยที่อุณหภูมิ 240 องศา เซลเซียส จนใส กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 ดูดสารละลายที่ได้นำไปวัดด้วยเครื่อง *Atomic Absorption Spectrophotometer* |
| Total Ca | ดูดสารละลายที่ได้จากการสกัด Total K ปรับปริมาตรด้วย Lanthanum chloride 0.2 % นำไปวัดด้วยเครื่อง *Atomic Absorption Spectrophotometer* |
| Total Mg | ดูดสารละลายที่ได้จากการสกัด Total K ปรับปริมาตรด้วย Lanthanum chloride 0.2 % นำไปวัดด้วยเครื่อง *Atomic Absorption Spectrophotometer* |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**1.3.2 วิธีการเพาะเมล็ดลงในวัสดุเพาะ**

นำวัสดุเพาะที่มีไมคอร์ไรซาเจริญแล้วชั่งใส่ในขวดแก้วขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว โดยชั่งวัสดุเพาะใส่ขวด ขวดละ 20 กรัม แล้วนำเมล็ดกล้วยไม้ดินแต่ละชนิดที่เตรียมไว้ตักโรยบนวัสดุเพาะ ซึ่งใช้เมล็ดกล้วยไม้ 10 มิลลิกรัมต่อขวด ปิดฝาขวด นำไปเก็บไว้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส และได้รับแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน รดน้ำทุก 15 วัน เป็นเวลา 12 ครั้ง (6 เดือน)

ได้วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมสุ่มสมบูรณ์ (Factorial (4×4) in CRD; Factorial in Completely Randomized Design) กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ดังนี้

**ปัจจัยที่ 1** วัสดุเพาะ 4 ชนิด ได้แก่ สแฟกนัมมอส กระเช้าสีดาแห้ง ใบก้ามปูและปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว

**ปัจจัยที่ 2** การไม่ใช้ไมคอร์ไรซาและใช้ไมคอร์ไรซา 3 ชนิด ได้แก่ เชื้อแอคติโนมัยซีท isolate DFR 001 ที่ได้จากรากของกล้วยไม้เหลืองจันทบูรณ์ เชื้อรา isolate DAR 004 ที่ได้จากลำลูกกล้วยของกล้วยไม้สายน้ำผึ้ง และเชื้อรา isolate DTR 001 ที่ได้จากใบของกล้วยไม้มอนไข่

**1.4 การบันทึกผลการทดลอง**

1.วิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียมและวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH) (กรมวิชาการเกษตร, 2548) ในวัสดุเพาะแต่ละชนิดก่อนที่ใส่ไมคอร์ไรซา

2. บันทึกวันที่เริ่มงอกและทำการประเมินจำนวนโปรโตคอร์มที่งอก หลังจากเพาะเมล็ด 6 เดือน

3. บันทึกลักษณะโปรโตคอร์มที่พัฒนาจากเมล็ดกล้วยไม้ เมื่อมีอายุ 6 เดือน โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

**การทดลองที่ 2 ผลของไมคอร์ไรซาต่อการเติบโตของลิ้นมังกรสีชมพู**

**2.1 วัสดุและอุปกรณ์ในการทดลอง**

2.1.1 วัสดุพันธุ์พืช

คัดต้นกล้าลิ้นมังกรสีชมพูที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ โดยคัดต้นที่มีความยาวต้นประมาณ 3 เซนติเมตร (ภาพที่ 5) จำนวนต้น 30 ต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ก.** **ข.** **ค.**

**ภาพที่ 5** ลักษณะต้นกล้าลิ้นมังกรสีชมพูที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ
ก. ลักษณะต้นกล้าที่มีอาหารวุ้นติดอยู่ ข. ลักษณะต้นกล้าที่ล้างอาหารวุ้นออกแล้ว
ค. ลักษณะต้นกล้าที่มีความยาวต้น 3 เซนติเมตร

2.1.2 วัสดุปลูก ได้แก่

1. ทราย
2. ใบก้ามปู

2.1.3 ไมคอร์ไรซา ได้แก่

1. *Humicola* sp.
2. *Fusarium* sp.
3. *Nodulisporium* sp.
4. *Oidiodendron* sp.
5. *Trichoderma* sp.

2.1.4 ถุงพลาสติก และยางรัด

2.1.5 เครื่องหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)

2.1.6 เครื่องบด

2.1.7 เครื่องชั่งสารและเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง

2.1.8 ตู้อบ (hot air over)

2.1.9 จานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร

2.1.10 ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อและใส่เม็ดข้าวฟ่าง

2.1.11 กระบอกตวง (cylinder) ขนาด 100 และ 500 มิลลิลิตร

2.1.12 บีกเกอร์ (beaker)

2.1.13 ตะเกียงแอลกอฮอล์

2.1.14 ช้อนตักสาร (spatula)

2.1.15 เข็มเขี่ย (needle)

2.1.16 พาราฟิล์ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.17 กระถางดินเผา ขนาด 7.5 เซนติเมตร

2.1.18 ขวดแก้วใส่น้ำ

2.1.19 ไม้บรรทัด

2.1.20 ปากกา

2.1.21 กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ

2.1.22 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบชนิดส่องกราด

**2.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง**

**2.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบการเข้ารา**

1. โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)
2. HCl
3. glutaraldyhyde
4. phosphate buffer
5. water blue

**2.3 วิธีการทดลอง**

**2.3.1 การเจริญเติบโตของลิ้นมังกรสีชมพู**

คัดเลือกต้นลิ้นมังกรสีชมพู ที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ โดยคัดต้นที่มีความยาวต้นประมาณ 3 เซนติเมตร นำมาปลูกในวัสดุปลูกที่ประกอบด้วย ทรายกับใบก้ามปูที่บดละเอียดในอัตราส่วน 1:1 แล้วปลูกไมคอร์ไรซาที่ต่างชนิดกัน คือ *Humicola* sp., *Fusarium* sp., *Nodulisporium* sp., *Oidiodendron* sp. และ *Trichoderma* sp. ตามลำดับ จำนวน $10^5$ เซลล์ต่อกรัมของวัสดุปลูก นับเชื้อโดยวิธี plating method (ยุพา, 2552) ลงไปในวัสดุปลูกที่เตรียมไว้ หมักไว้ 2 สัปดาห์ ในสภาพห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และควบคุมความชื้นของวัสดุปลูกที่ 60 % นำวัสดุปลูกใส่ในกระถางดินเผาที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 7.5 เซนติเมตร ปลูกกล้วยไม้ลงในวัสดุปลูก 1 ต้นต่อกระถาง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomize Design: CRD) จำนวน 6 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 วัสดุปลูกไม่มีไมคอร์ไรซา (กรรมวิธีควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 วัสดุปลูกร่วมกับเชื้อ *Humicola* sp.

กรรมวิธีที่ 3 วัสดุปลูกร่วมกับเชื้อ *Fusarium* sp.

กรรมวิธีที่ 4 วัสดุปลูกร่วมกับเชื้อ *Nodulisporium* sp.

กรรมวิธีที่ 5 วัสดุปลูกร่วมกับเชื้อ *Oidiodendron* sp.

กรรมวิธีที่ 6 วัสดุปลูกร่วมกับเชื้อ *Trichoderma* sp.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไมคอร์ไรซาทั้งหมดนี้ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ของจักรพงศ์ (2553) ซึ่งได้แยกไมคอร์ไรซาจากรากของกล้วยไม้ว่านจูงนางที่มีสภาพที่สมบูรณ์และไม่มีลักษณะของการเกิดโรค และจากผลการทดลองของ อามีนา (2554) และนิภาพรรณ (2554) นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้คัดเลือกไมคอร์ไรซาที่มีการผลิตฮอร์โมนพืชและละลายฟอสฟอรัสสูง ปานกลาง และต่ำ นำกระถางของแต่ละกรรมวิธีดังกล่าว เก็บไว้ในห้องที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส และได้รับแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน เท่ากันทุกกรรมวิธี ทำการรดน้ำ สัปดาห์ละ 2 ครั้ง (5 เดือน) น้ำที่ใช้รดผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

บันทึกการเจริญเติบโตและการพัฒนาทุกๆ 2 สัปดาห์

1. วัดความยาวของต้น (ซม.) วัดจากโคนต้นถึงปลายยอดที่สูงที่สุด
2. จำนวนใบต่อต้น

**2.3.2 วิธีการตรวจสอบการเข้าราก**

เมื่อปลูกต้นลิ้นมังกรสีชมพูในวัสดุปลูกที่มีการใส่ไมคอร์ไรซา หลังปลูกนาน 5 เดือน นำตัวอย่างรากของต้นพืชออกมาล้างให้สะอาด แล้วผ่านกระบวนการ clearing root โดยใช้สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 10 % (w/v) แช่ไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำรากมาล้างด้วยน้ำสะอาด และแช่ในสารละลายไฮโดรคลอริก เข้มข้น 1 % (v/v) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาล้างด้วยน้ำสะอาดอีกครั้ง แล้วนำมาแช่สารละลาย water blue 0.06% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ตารางภาคผนวกที่ 1) เพื่อย้อมสีราก จากนั้นนำรากที่ย้อมสีแล้วมาตัด (section) แล้ววางบนสไลด์ที่หยดสารละลายกลีเซอรีน วางรากในแนวขวาง โดยทำการตัดรากให้มีความยาว 1-2 เซนติเมตร แล้วปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ จากนั้นนำไปตรวจสอบการเข้ารากภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ

ส่วนการตรวจสอบการเข้ารากภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบชนิดส่องกราด โดยนำรากตัวอย่างส่งที่ศูนย์วิจัยและบริการจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ศวท-มช. มีวิธีการเตรียมตัวอย่างดังนี้ คือ ตัดรากลิ้นมังกรสีชมพูทุกกรรมวิธีที่ใส่ไมคอร์ไรซา หลังปลูกอายุ 5 เดือน นำตัวอย่างรากทำความสะอาด ตัดรากความหนาของรากขนาดประมาณ 5 มิลลิเมตร จำนวน 3-4 ชิ้นต่อตัวอย่าง นำไปแช่ในสารละลาย glutaraldyhyde 2.5 % ใน 0.1 M phosphate buffer เพื่อรักษาสภาพ (fixing) โครงสร้างและส่วนประกอบของเซลล์ แล้วล้างออกด้วย 0.2 M phosphate buffer pH 7.2 และแช่ในสารละลาย osmium tetraoxide 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.1 M phosphate buffer เพื่อรักษาสภาพเซลล์ แล้วล้างออกด้วย 0.2 M phosphate buffer pH 7.2 ขั้นตอนต่อมาคือ การไล่น้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) โดยการแทนที่น้ำด้วย alcohol ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นตามลำดับ จาก 30, 50, 70, 80, 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ 2-3 ครั้ง ตามลำดับ โดยใช้เวลา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แช่ในแต่ละความเข้มข้น 5-10 นาที ทำให้แห้ง (drying) ด้วยการรมตัวอย่างด้วย $CO_2$ นำรากมาตัดให้มีความหนาของรากขนาดประมาณ 1-2 มิลลิเมตร จำนวน 3-4 ชิ้นต่อตัวอย่าง แล้วทำการเคลือบตัวอย่างด้วยอนุภาคทองหนา 30 นาโนเมตร นำตัวอย่างที่ได้มาศึกษาส่องดูเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบชนิดส่องกราด (JEOL รุ่น JSM-5910LV) พร้อมทั้งบันทึกภาพลักษณะเส้นใยของไมคอร์ไรซาชนิดต่างๆ

**สถานที่ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล :**

1. ห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ดิน สาขาปฐพีศาสตร์และอนุรักษ์ศาสตร์ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2. ศูนย์วิจัยและบริการจุลทรรศน์ศาสตร์อิเล็กตรอน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3. เรือนเพาะชำกล้วยไม้ ศูนย์วิจัยสาธิตและฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

**ระยะเวลาดำเนินการวิจัย**

เดือนกันยายน 2552 – เดือนมีนาคม 2554

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved