



บทที่ ๒

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

พืชทดลอง กล้วยไม้สกุลคีนโครบิอุม ๘ ชนิด บรัสโซเจลิโอแคตเตเลีย ๑ ชนิด แวนด้า ๑ ชนิด อะรันด้า ๑ ชนิด (ชื่อ species เรียกตาม Holttum, 1953; ชื่อลูกผสม เรียกตาม Sander and Wreford, 1961)

ตารางที่ ๑ กล้วยไม้ที่ไซทอลอง

ลำดับที่	ชื่อ	ชุดโครโมโซม	แม่ X พ่อ
1	<u>Dendrobium</u> x Jaquelyn Thomas No. 45	2x	(จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ)
2	<u>Dendrobium veratrifolium</u> No.47	2x	(X)
3	<u>Dendrobium phalaenopsis</u>	2x*	(X)
4	<u>Dendrobium</u> x Vivian Lau	3x*	<u>Dendrobium taurinum</u> (2x*) x <u>Dendrobium</u> x May Neal (4x)
5	<u>Dendrobium</u> (unnamed hybrid)	4x*	<u>Dendrobium</u> x Jaquelyn Thomas No. 30 (4x) x <u>Dendrobium</u> x Ong Geok Khim 'River King' (4x)
6	<u>Brassolaeliocattleya</u> x Evelyn Woo	3x*	<u>Cattleya bowingiana</u> 'lilacina' (2x) x <u>Brassolaeliocattleya</u> x Normans Bay 'Lows' (4x)
7	<u>Vanda</u> x T.M.A.	3x*	<u>Vanda</u> x Josephine Van Brero 'Tan Hoon Sieng' (4x) x <u>Vanda sanderana</u> (2x*)
8	<u>Aranda</u> (unnamed hybrid)	-	<u>Vanda</u> x Pranerm Ornate x <u>Arachnis</u> x Maggie Oei

* จากการศึกษาคละเน

- อาหาร แบบ ๑. อาหารวุ้นและอาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ (meristem) ใช้ตามสูตรซึ่งดัดแปลงมาจาก Murashige and Skoog (1962), Schenk and Hildebrandt (1972), Nitsch (1972)
๒. คลายอาหารแบบ ๑ แต่ไม่ได้ organic addenda, วุ้น และ auxin
๓. คลายอาหารแบบ ๒ แต่ใช้ธาตุหลักตามสูตรของ Knudson (1946) แทน
๔. คลายอาหารเหลวแบบ ๒ แต่ใช้ FeSO₄ แทน FeEDTA (ดูรายละเอียดจากภาคผนวก)

วิธีล้างเครื่องแก้ว

แช่คอนโทแก้วขนาด ๒๐๐ - ๒๕๐ มล. ในกรดล้างแก้ว (sulphuric acid : potassium dichromate 1 : 1) อย่างน้อย ๓๐ นาที นำขึ้นมาล้างน้ำประปา ๑๐ ครั้ง แล้วฉีดด้วยน้ำกลั่นแก้ว ๓ ครั้ง แล้วอบให้แห้ง

วิธีดำเนินการทดลอง

เลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ (meristem) ของกล้วยไม้ ในอาหาร ตามวิธีของ Morel (1965); Sagawa, Shoji and Shoji (1966) และ Vajrabhaya and Vajrabhaya (1970) เพื่อให้เนื้อเยื่อเจริญเจริญเป็น protocorm, protocorm - like body หรือต้นอ่อนขนาดตามต้องการ

เตรียมอาหารเหลวใส่คอนโทละ ๒๕ มล. ปิดปากคอนโทด้วยกระดาษอะลูมิเนียม มาเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ ๗๐% ช. ที่ความดัน ๑ ก.ก./ช.ม. ๒ เวลา ๑๕ นาที แบ่งอาหารที่ฆ่าเชื้อแล้วเป็น ๒ ส่วน ส่วนตัวอย่างวัดพีเอช ปรึบให้เป็น ๔, ๕, ๖, ๗, ๘ ด้วย HCl หรือ NaOH ความเข้มข้นระหว่าง 0.01 ถึง 0.1 N. ใช้ความเข้มข้นและปริมาณของ HCl หรือ NaOH ที่ใช้สำหรับส่วนตัวอย่างนี้ไปปรับพีเอชในอาหารส่วนที่เหลือให้เป็น ๔, ๕, ๖, ๗, ๘ โดยทำในสภาพปลอดเชื้อ แต่ละการทดลองทำ ๔ ซ้ำ

ใส่ protocorm, protocorm - like body หรือต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ดหรือเนื้อเยื่อเจริญ (ดูตารางที่ ๒ รูปที่ ๑, ๒, ๓, ๔) ลงในคนโทแก้วที่ปรับพีเอชแล้ว พยายามให้น้ำหนักและขนาดของพืชในแต่ละคนโทใกล้เคียงกัน (การชั่งน้ำหนักเริ่มต้นทำโดยการชั่งคนโทที่มีอาหารเหลวก่อนและหลังใส่พืช ผลต่างคือน้ำหนักเริ่มต้น)

ใช้กระดาษกาวพันปากขวดทรงบริเวรรอยคอของกระดาษอะลูมิเนียม เพื่อป้องกันจุดินทรีย์เข้า เลี้ยงในห้องที่มีอุณหภูมิประมาณ 27 ± 2 °C. ให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มของแสง ๒,๐๐๐ ถึง ๓,๐๐๐ ลักส์ วันละ ๑๔ ชม. และช่วงมืด ๑๒ ชม. เป็นเวลา ๒ เดือน

- การวัดผล
๑. วัดพีเอชสุดท้ายของอาหารเหลว
 ๒. ชั่งน้ำหนักสุดท้ายของกล้วยไม้ โดยนำเอาต้นอ่อนออกมาชั่งโดยตรง
 ๓. สุ่มตัวอย่างชวลละ ๕ ถึง ๑๐ ต้น แล้วศึกษาการเจริญจาก
 - ๓.๑ ความสูง (วัดจากโคนต้นจนถึงปลายใบ ใบที่ยาวที่สุด)
 - ๓.๒ จำนวนใบทั้งหมด
 - ๓.๓ ความยาวใบ (วัดใบที่ยาวที่สุด)
 - ๓.๔ จำนวนรากทั้งหมด
 - ๓.๕ ความยาวราก (วัดรากที่ยาวที่สุดจากโคนต้นถึงปลายราก)

แผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองครั้งนี้วางแผนแบบ completely randomized design แล้ววิเคราะห์น้ำหนักสดก่อนและหลังการทดลองแบบ covariance ที่ความเชื่อมั่น ๙๕ % เนื่องจากน้ำหนักสดเริ่มในแต่ละชวลไม่เท่ากัน (แต่ใกล้เคียงกันมาก) ดังนั้น จึงต้องหาน้ำหนักสดที่ปรับแล้ว (Adjusted Mean) (ดูภาคผนวก) ในการเปรียบเทียบความแตกต่าง

การเจริญเปรียบเทียบทีละคู่ โดยใช้ t - test ที่ความเชื่อมั่น ๙๕ %

ตารางที่ ๒ ระยะเวลาเลี้ยงไม้ที่นำมาทดลองและอาหารที่ใช้ทดลอง

ตัวอย่างพืช	ชื่อ	ระยะการเจริญ	เริ่มจาก	อาหารแบบที่	หมายเหตุ
1	<i>Dendrobium</i> x Jaquelyn Thomas No.45 (2x)	protocorm-like body บางคนเริ่มมีใบ	การเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ	๒	เก็บผลทุก ๒ สัปดาห์
2	<i>Dendrobium</i> x Jaquelyn Thomas No.45 (2x)	protocorm-like body บางคนเริ่มมีใบ	การเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ	๓	
3	<i>Dendrobium</i> x Jaquelyn Thomas No.45 (2x)	protocorm-like body บางคนเริ่มมีใบ	การเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ	๔	
4	<i>Dendrobium veratrifolium</i> No.47 (2x)	คนอ่อนมีใบ ไม่มีราก	การเพาะเมล็ด	๒	
5	<i>Dendrobium phalaenopsis</i> (2x)	คนอ่อนมีใบ บางคนเริ่มมีราก	การเพาะเมล็ด	๒	
6	<i>Dendrobium</i> x Vivian Lau (3x)	คนอ่อนมีใบ มีราก	การเพาะเมล็ด	๒	
7	<i>Dendrobium</i> (unnamed hybrid) (4x)	คนอ่อนมีใบ มีราก	การเพาะเมล็ด	๒	
8	<i>Brassolaeliocattleya</i> x Evelyn Woo (3x)	คนอ่อนมีใบ บางคนเริ่มมีราก	การเพาะเมล็ด	๒	
9	<i>Vanda</i> x T.M.A. (3x)	คนอ่อนมีใบ มีราก	การเพาะเมล็ด	๒	
10	<i>Aranda</i> (unnamed hybrid) (-)	คนอ่อนมีใบ มีราก	การเพาะเมล็ด	๒	
11	ไม้ใส่พืชทดลอง		-	๒	เก็บในสภาพแวดล้อมเดียวกับที่ใส่พืชทดลอง

รูปที่ ๑

Dendrobium x Jaquelyn Thomas No. 45
protocorm - like body บางต้นเริ่มมีใบ

รูปที่ ๒

Dendrobium veratrifolium No. 47 ต้นอ่อนมีใบ ไม่มีราก

รูปที่ ๓

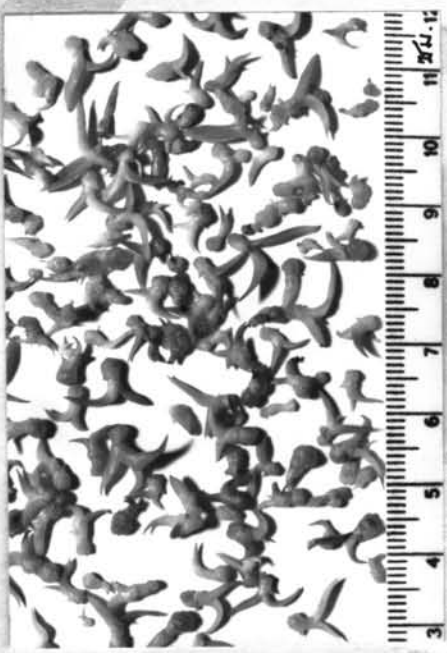
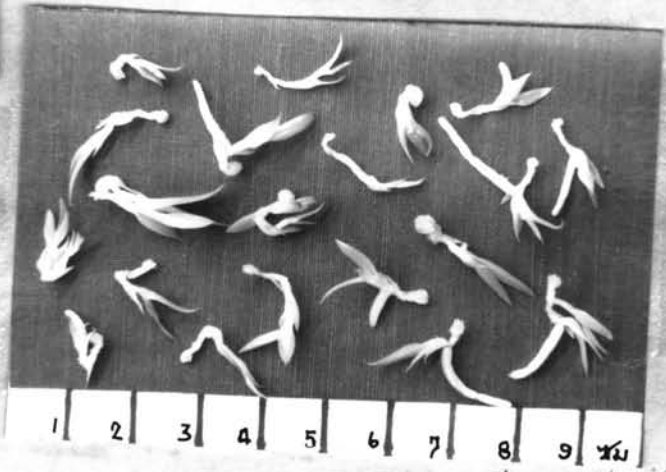
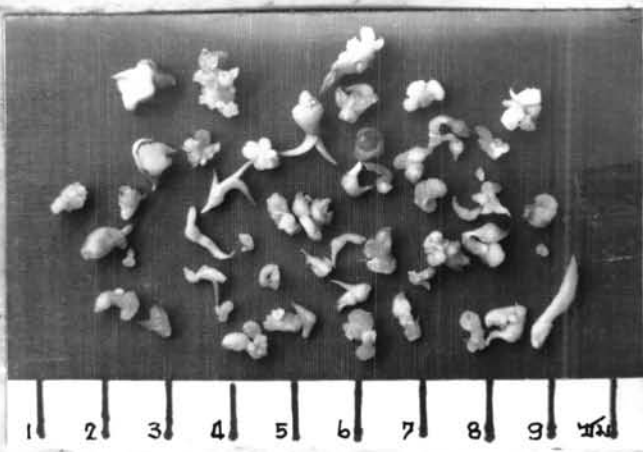
Brassolaeliocattleya x Evelyn Woo
ต้นอ่อนมีใบ บางต้นเริ่มมีราก

รูปที่ ๔

Vanda x T.M.A. ต้นอ่อนมีใบ มีราก

รูปที่ ๕

ลักษณะของกล้วยไม้เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว



๑๖