บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

วัสดุ

1. พืชทดลอง

เมล็ด

ลูกผสมของ (Cattleya Claesiana x Bc. Pastoral)

ลูกผสมของ (Dendrobium bigibbum x Den. Merritt Island)

ต้นอ่อน

Den. Merritt Island

หน่ออ่อน

ลูกผสมของ (Den. Ong Geok Khim x Den. antennatum)

แคลลัส

Den. Merritt Island

พืชทดลองทั้งหมดนี้ได้รับความกรุณาจาก ศาสตราจารย์ ดร. ถาวร วัชราภัย

2. สารเคมี

สารประกอบอนินทรีย์

ในสูตร Modified SH (ดูหน้า 14)

สารประกอบอนินทรีย์อื่น ๆ

Ammonium chloride (NH_4Cl)

Potassium chloride (KCl)

Potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4)

Sodium nitrate ($NaNo_3$)

สารประกอบอินทรีย์

เนื้อผลกล้วยหอม

ลำต้นใต้ดินมันฝรั่ง

ปุ๋ยปลาสำเร็จรูป (Atlas Fish Emulsion Fertilizer)

แป้งข้าวโพด ตรา Maizena

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้ว

สำหรับเพาะเมล็ดและเลี้ยงต้นอ่อน

Erlenmeyer flask ขนาด 200 มล.

สำหรับเลี้ยงและชักนำแคลลัส

vial ขนาด 35 มล. (เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ซม.)

2. เครื่องวัดพื้นที่ใบ

digital planimeter Koizumi รุ่น KP-90N

3. เครื่องชั่งน้ำหนัก (บอกความละเอียด ทศนิยม 2 ตำแหน่ง)

วัสดุและอุปกรณ์อื่น ๆ ที่ใช้เลี้ยงพืชในสภาพปลอดเชื้อในการวิจัยนี้ใช้ตามมาตรฐานของห้องปฏิบัติการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทั่วไป

ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ

อุณหภูมิห้อง 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิในขวดเลี้ยง 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส

ชนิดของหลอดไฟ Philips TL 40 W/33

ระยะเวลาเปิดไฟ 16 ชั่วโมง

ระยะระหว่างหลอดไฟกับใบ 25 ซม.

ความเข้มของแสงที่ระดับใบ 1,500 - 2,000 ลักซ์

การออกแบบการทดลองและบันทึกผล

1. การเจริญของเมล็ดกล้วยไม้

นำเมล็ดที่เตรียมไว้ตามขั้นตอน เลี้ยงบนอาหารสูตรทดลองใน flask ที่มีวุ้นอาหารปริมาณ flask ละ 50 มล. flask ละ 300-400 เมล็ดทุกสูตรทดลอง บันทึกผลการทดลองเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 80 และ 120 วัน โดยให้เป็นคะแนนดังนี้

0 = ในช่วงแรกเอมบริโอตายหรือเจริญมีสีเขียวและตายในเวลาต่อมา

1 = เอมบริโอเป็นสีเขียว แต่ไม่เจริญเกิน 5 เท่า

2 = เอมบริโอเป็นสีเขียว เจริญช้า ถึงขั้นใกล้มีใบ

4 = คล้าย 2 คะแนน แต่ขนาดเอมบริโอใหญ่กว่ามาก

6* = เอมบริโอส่วนใหญ่เจริญเป็นแคลลัส มีการพัฒนาเป็นยอดมีใบเล็กผิดปกติ บางก้อนพัฒนาเป็นต้นมีใบและรากปกติ

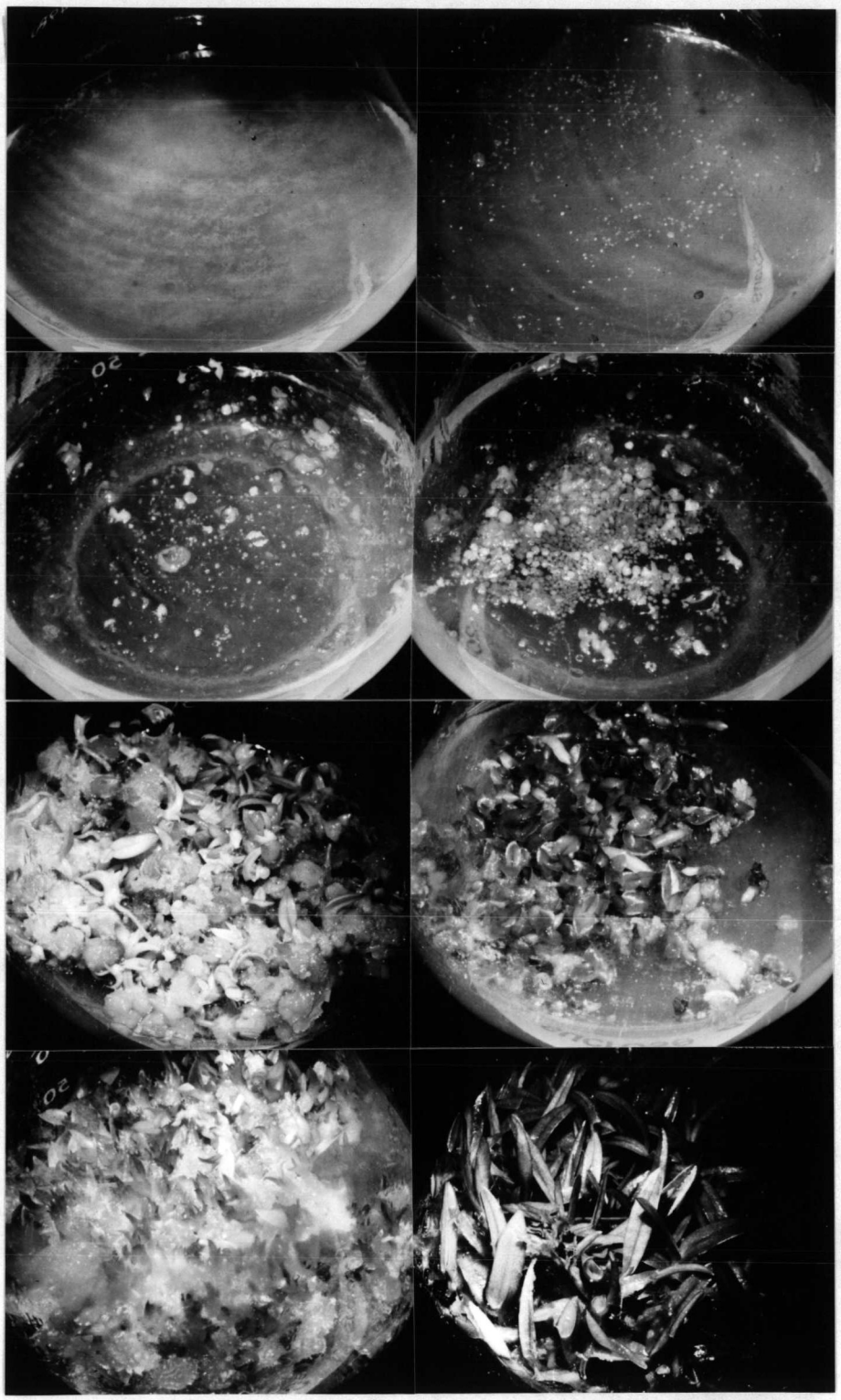
6** = เอมบริโอเจริญดี พัฒนาเป็นต้นอ่อนมีใบและบางต้นมีราก

8* = การเจริญอยู่ระหว่าง 6* คะแนน และ 10* คะแนน

8** = การเจริญอยู่ระหว่าง 6** คะแนน และ 10** คะแนน

10* = เอมบริโอส่วนใหญ่เจริญเป็นแคลลัสขนาดใหญ่ มีการพัฒนาเป็นยอดและต้น คล้าย 6* คะแนน

10** = เอมบริโอเจริญดีมาก พัฒนาเป็นต้นอ่อน มีใบใหญ่และส่วนมากมีราก



ภาพที่ 1 ตัวอย่างการเจริญของเมล็ดกล้วยไม้ระยะต่างๆ ให้เป็นคะแนนดังนี้

A = 0 B = 1 C = 2 D = 4

E = 6* F = 6**

G = 10* H = 10**

2. การเจริญของตาจากหน่ออ่อน และแคลลัส

เลี้ยงตาจากหน่ออ่อน หรือแคลลัสที่เตรียมไว้ vial ละ 1 ชิ้น ซึ่งบรรจุวุ้นอาหาร vial ละ 25 มล. บันทึกผลหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 80 วัน โดยการชั่งน้ำหนักสด

3. การเจริญของต้นอ่อน

เลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้ขนาด 0.7 - 1.0 ซม. ที่เตรียมไว้ flask ละ 10 ต้น ใน Erlenmeyer flask ที่บรรจุวุ้นอาหาร flask ละ 50 มล. บันทึกผลหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน ดังนี้

3.1 ชั่งน้ำหนักสดรวมของต้นกล้วยไม้ต่อ flask จำนวน 6-10 flask

3.2 ศึกษาการเจริญของต้นกล้วยไม้ที่เจริญดีที่สุด 3-4 flask แต่ละ flask เลือกต้นที่ดีที่สุด 5 ต้น โดยการตรวจนับและวัดดังนี้

- จำนวนหน่อใหม่ต่อต้น
- จำนวนรากทั้งหมดต่อต้น
- ความยาวราก (วัดรากยาวที่สุดจากโคนต้นถึงปลายรากต้นละ 1 ราก)
- จำนวนใบทั้งหมดต่อต้น
- ความสูง (วัดจากโคนต้นถึงปลายใบ)

3.3 วัดพื้นที่ใบจากต้นที่นำมาศึกษาการเจริญโดยใช้ใบที่ 2 จากยอดตัดที่ abscision zone นำมาติดบนแผ่นกระดาษโดยใช้เทปใส แล้วนำไปถ่ายเป็นแบบเพื่อนำไปวัดความกว้าง (ส่วนที่กว้างที่สุด) ความยาว (abscision zone ถึงปลายใบ) และพื้นที่ใบด้วย planimeter

การสร้างสมการถดถอยเชิงเส้น (Regression Equation) เพื่อใช้ทำนายการวัดพื้นที่ใบของกล้วยไม้

1. สุ่มตัวอย่างของใบกล้วยไม้จากหลายการทดลอง จำนวน 100 ใบ

2. วัดความกว้าง และความยาวของใบแต่ละใบ คำนวณความกว้าง x ยาว พร้อมทั้งหาพื้นที่ใบโดยใช้เครื่องมือวัดพื้นที่ใบ (planimeter)

3. นำข้อมูลที่ได้จากข้อ 2. ไปคำนวณหาสมการถดถอยเชิงเส้นโดยใช้คอมพิวเตอร์และโปรแกรมสำเร็จรูป Lotus 123

ข้อมูลที่ได้จากการคำนวณ

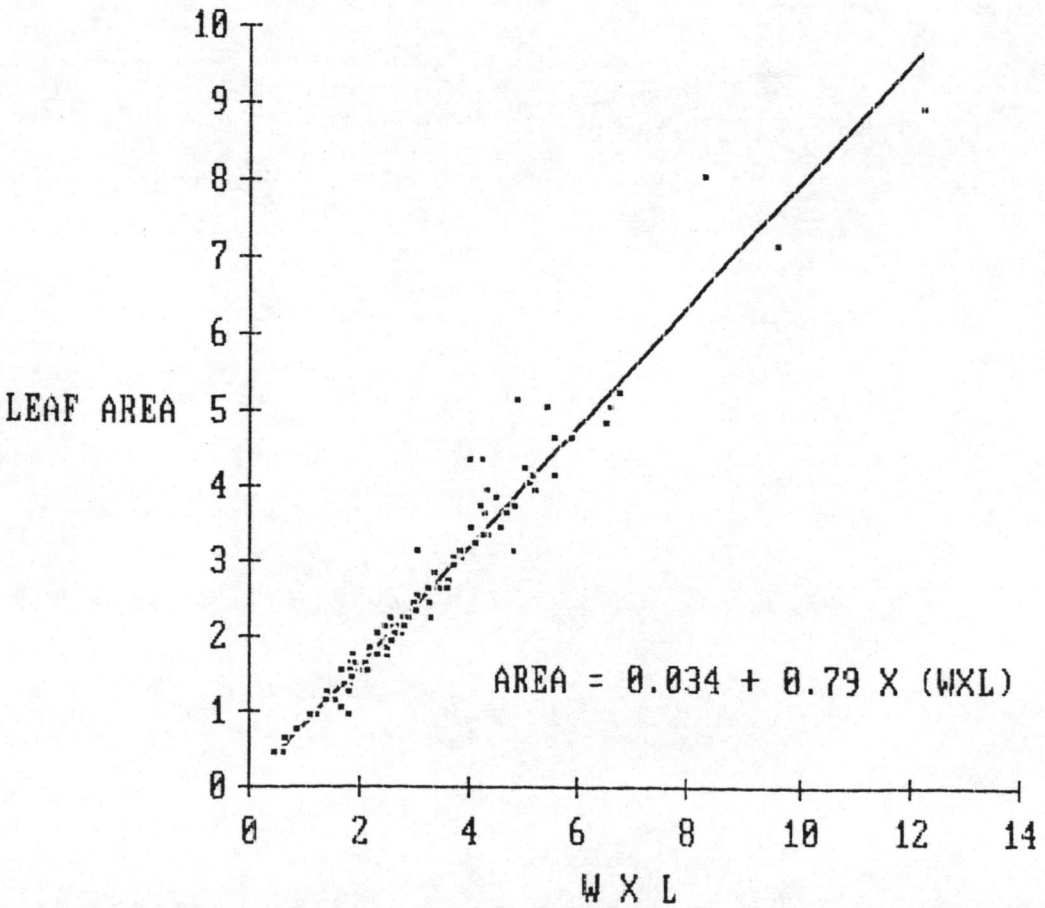
regression output

constant	0.03429
Std Err of Y Est	0.33397
R squared	0.95336
No. of observation	100
degree of freedom	98
X coefficients	0.78899
Std Err of Coef.	0.01762

จากสูตรสมการถดถอยเชิงเส้น $Y = a + bX$

ดังนั้นสมการถดถอยเชิงเส้นของพื้นที่ใบกล้วยไม้ ได้ดังนี้

$$AREA = 0.034 + 0.79 (W \times L)$$



วิธีดำเนินงานวิจัย

1. เตรียมพืชทดลองแบบปลอดเชื้อ

เมล็ดกล้วยไม้

ใช้ฝักกล้วยไม้อายุประมาณ 75 - 90 วันหรืออายุฝัก 60 % ซึ่งยังไม่แตก ตัดส่วนที่เป็น column รวมส่วนที่เหลือของ sepal และ petal ออก ฆ่าเชื้อที่ผิวของฝักกล้วยไม้ก่อนผ่าเอาเมล็ด ด้วยการจุ่มในแอลกอฮอล์ 95 % แล้วเผา

การทดลองเพาะเมล็ดกล้วยไม้บนอาหารสูตรดัดแปลงใหม่ ถ้าเป็นกล้วยไม้ชนิดเดียวกันใช้จาก 1 ฝัก โดยนำเมล็ดที่ฆ่าเชื้อแล้วเติมน้ำสะอาดแล้วคนให้เมล็ดกระจาย ใช้หลอดหยดดูดใส่ลงบนอาหารขวดละ 300-400 เมล็ด

ต้นอ่อนกล้วยไม้

ใช้ต้นอ่อนมีขนาดสูงประมาณ 0.3 - 0.5 ซม. เลือกเอาต้นขนาดใกล้เคียงกันเลี้ยงในอาหารสูตร Modified SH จนได้ขนาดต้นเฉลี่ย 0.7 - 1.0 ซม. คัดต้นที่มีขนาดใกล้เคียงกันย้ายลงในอาหารทดลองใน Erlenmeyer flask ขนาด 200 มล. ขวดละ 10 ต้น

ตาจากหน่ออ่อน

ใช้ตายอด (terminal bud) และตาข้าง (lateral bud) จากหน่อใหม่ขนาดสูง 5.0 - 8.0 ซม. ฆ่าเชื้อและแยกตาออกจากหน่อด้วยวิธีมาตรฐานการเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ (ถาวร วัชราภัย และ มนทกานติ วัชราภัย, 2519)

ขนาดของตาที่ตัดสำหรับการทดลองคือ 3 x 3 มม.

แคลลัส

ย้ายต้นอ่อนที่เพาะอายุประมาณ 30 วัน ลงเลี้ยงในอาหารที่ไม่ใส่วุ้นสูตร Modified SH ที่เติม NAA 0.5 มก./ ล. และน้ำมะพร้าว 100 มล./ล.เขย่าด้วย rotary shaker ความเร็วประมาณ 75 รอบต่อนาที เพื่อให้ได้แคลลัสจำนวนมาก เลือกแคลลัสที่มีขนาดใกล้เคียงกันเลี้ยงบนอาหารทดลองใน vial ฝาเกลียวทึบ vial ละ 1 แคลลัส

2. การเตรียมสารอินทรีย์เสริมที่ใช้ในการทดลอง

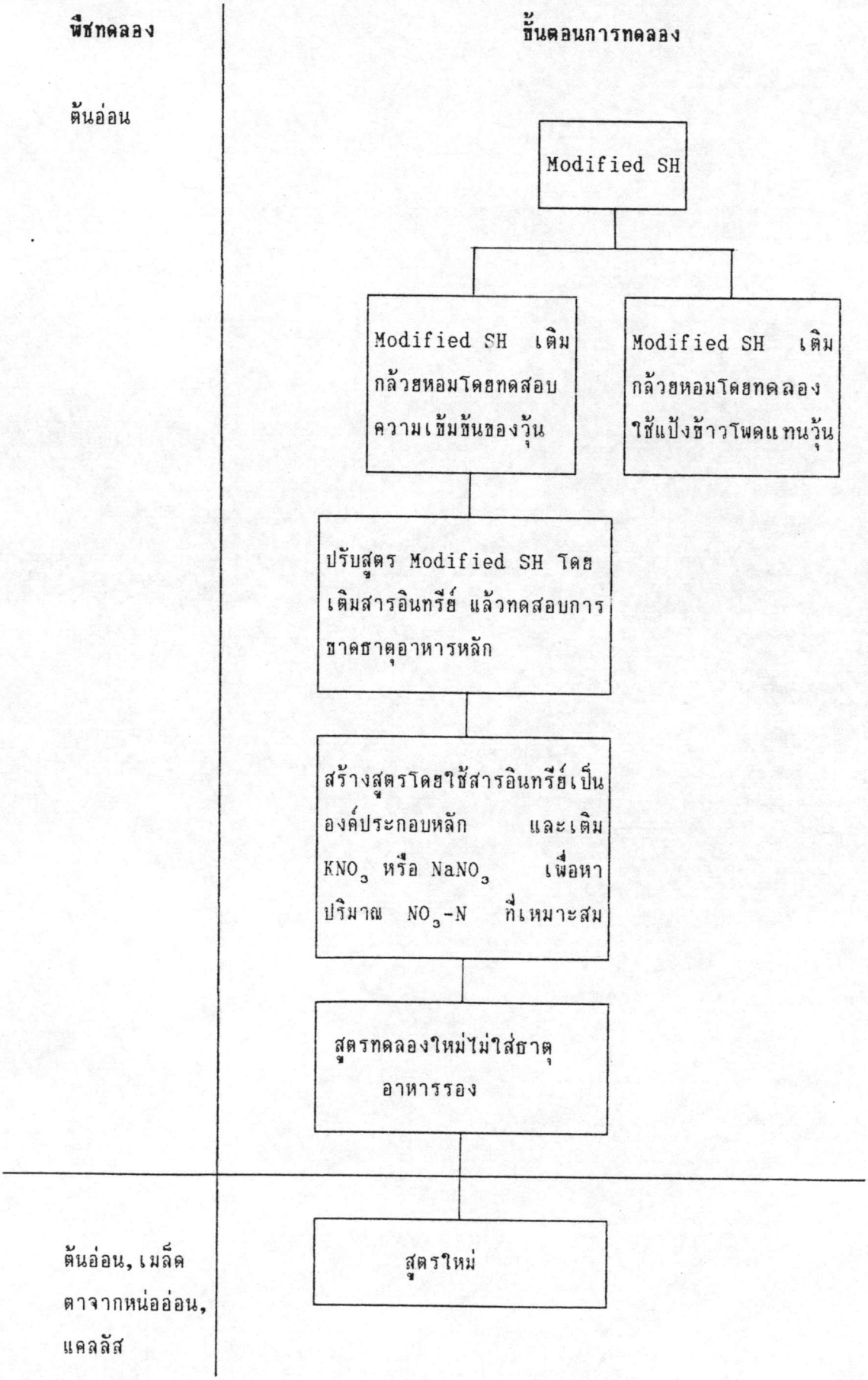
กล้วยหอมและมันฝรั่ง

ใช้เนื้อผลกล้วยหอมหรือเนื้อมันฝรั่งที่ปอกเปลือกแล้ว 150 กรัม หั่นเป็นรูปลูกบาศก์ขนาด 1 x 1 ซม. เติมน้ำ 150 - 200 มล. นำไปต้มให้เดือดหลังจากนั้นบดด้วยเครื่องปั่นจนกระทั่งละเอียดแล้วนำไปผสมกับน้ำและสารอาหารอื่น

ปุ๋ยปลา

ใช้ปุ๋ยปลาสำเร็จรูป 4 - 6 มล./ล. แล้วแต่กรณี

3. แผนการวิจัย


พืชทดลอง
ขั้นตอนการทดลอง
ต้นอ่อน
Modified SH
Modified SH เติมกล้วยหอมโดยทดสอบความเข้มข้นของวุ้น
Modified SH เติมกล้วยหอมโดยทดลองใช้แป้งข้าวโพดแทนวุ้น
ปรับสูตร Modified SH โดยเติมสารอินทรีย์ แล้วทดสอบการขาดธาตุอาหารหลัก
สร้างสูตรโดยใช้สารอินทรีย์เป็นองค์ประกอบหลัก และเติม KNO_3 หรือ $NaNO_3$ เพื่อหาปริมาณ NO_3-N ที่เหมาะสม
สูตรทดลองใหม่ไม่ใส่ธาตุอาหารรอง
ต้นอ่อน, เมล็ด ตาจากหน่ออ่อน, แคลลัส
สูตรใหม่

สูตรอาหารเปรียบเทียบสำหรับเลี้ยงต้นอ่อน เลี้ยงเนื้อเยื่อ และเพาะเมล็ดกล้วยไม้คือ Modified SH ซึ่งทดลองได้ผลดีกับกล้วยไม้สกุล Dendrobium โดยมีส่วนประกอบของสูตรดังนี้

ชื่อสารเคมี	สูตรโมเลกุล	ปริมาณ (mg/l)
1. ธาตุอาหารหลัก ตามสูตรของถาวร วัชราภัย และ มนทกานติ วัชราภัย (2519) คือ 1/2 ของสูตร Schenk and Hildebrandt (1972)		
Ammonium dihydrogen orthophosphate	$NH_4H_2PO_4$	150.00
Calcium chloride	$CaCl_2.2H_2O$	100.00
Magnesium sulphate	$MgSO_4.7H_2O$	200.00
Potassium nitrate	KNO_3	1,250.00
2. ธาตุอาหารรอง ตามสูตรของ Schenk and Hildebrandt (1972)		
Boric acid	H_3BO_3	5.00
Cobalt chloride	$CoCl_2.6H_2O$	0.10
Copper sulphate	$CuSO_4.5H_2O$	0.20
Manganese sulphate	$MnSO_4.H_2O$	10.00
Potassium iodine	KI	1.00
Sodium molybdate	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.10
Zinc sulphate	$ZnSO_4.7H_2O$	1.00
Ethylene diamine tetra-acetic acid (disodium salt)	Na_2 EDTA.$2H_2O$	20.00
Ferrous sulphate	$FeSO_4.7H_2O$	15.00
3. สารที่ทำให้อาหารแข็ง วุ้น		8,000
4. แหล่งคาร์บอน ตามการทดลองของ Valmayor (1972)		
Sucrose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	40,000
5. ตัวทำละลาย		
Deionized water	H_2O	เติมให้เป็น 1 ลิตร

pH หลังการฆ่าเชื้อวัดที่อุณหภูมิห้อง 5.8 ถึง 6.2 และไม่ปรับตามการทดลองของ Piriyakanjanakul and Vajrabhaya (1980)

หมายเหตุ เมื่อใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อ เติม NAA 0.5 mg/l และน้ำมะพร้าวอ่อน 100 ml/l

4. การดัดแปลงสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงต้นอ่อน

4.1 การหาความเข้มข้นของวุ้นที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้ เพื่อต้องการทราบความเข้มข้นของวุ้นที่ต้นอ่อนกล้วยไม้เจริญดีที่สุด และความเข้มข้นที่ประหยัดที่สุดโดยเลี้ยงต้นอ่อนบนอาหารสูตร Modified SH (Mod. SH) เติมกล้วยหอม 150 กรัมต่อลิตร ซูโครส 40 กรัมต่อลิตร และวุ้น 4, 6 และ 8 กรัมต่อลิตร รวมทั้งหมด 3 สูตรทดลอง

4.2 ทดลองใช้แป้งข้าวโพดหรือวุ้นโดยใช้สูตร Mod. SH เป็นหลัก

ตารางที่ 1 การใช้แป้งข้าวโพดหรือวุ้น ในสูตร Mod. SH เติมกล้วยหอม

สูตรทดลอง	สูตรอาหารหลัก	กล้วยหอม (g/l)	สารที่ทำให้อาหารแข็ง (g/l)
1	Mod. SH(1)	150	วุ้น 4
2	Mod. SH	0	แป้งข้าวโพด 40
3	Mod. SH	150	แป้งข้าวโพด 40
4	Mod. SH	150	แป้งข้าวโพด 60
5	Mod. SH	150	แป้งข้าวโพด 80

(1) สูตรอาหาร Mod.SH ประกอบด้วยธาตุอาหารหลักครึ่งหนึ่งของ SH ในที่นี้เรียกว่า 1/2SH ธาตุอาหารรองตาม SH และซูโครส 40 g/l

4.3 การใช้สารอินทรีย์แทนสารอนินทรีย์

ตารางที่ 2 สูตรทดลองเพื่อทดสอบการขาดธาตุอาหารหลัก เมื่อเติมสารอินทรีย์แต่ละชนิดในสูตร Mod.SH

สูตรทดลอง	สูตรเปรียบเทียบ Mod.SH(1)	ธาตุที่ลด	สารอนินทรีย์ ลด(2)	สารอนินทรีย์ เพิ่ม(3)	สารอินทรีย์(4) กล้วยหอม (g/l)	มันฝรั่ง (g/l)	ปุ๋ยปลา (ml/l)
1	+	–	–	–	0	0	0
2	+	–	–	–	150	150	6
3	-	–	–	–	150	150	6
4	+	Mg, S	$MgSO_4.7H_2O$	–	150	150	6
5	+	Ca, Cl	$CaCl_2.2H_2O$	–	150	150	6
6	+	NH_4^+, P	$NH_4H_2PO_4$	–	150	150	6
7	+	P	$NH_4H_2PO_4$	NH_4Cl	150	150	6
8	+	NH_4^+	$NH_4H_2PO_4$	KH_2PO_4	150	150	6
9	+	NO_3^-, K	KNO_3	–	150	150	6
10	+	NO_3^-	KNO_3	KCl	150	150	6
11	+	K	KNO_3	$NaNO_3$	150	150	6

* สูตรอาหารทดลองในขั้นตอนนี้รวมทั้งหมด 33 สูตรทดลอง

(1) สูตรอาหารเทียบประกอบด้วยธาตุอาหารหลัก 1/2 SH ธาตุอาหารรองตาม SH ซูโครส 40 g/l และวุ้น 4 g/l (ยกเว้นสูตรที่เติมปุ๋ยปลาใส่วุ้น 8 g/l)

(2) การลดสารอนินทรีย์คือไม่เติมสารนั้นในสูตรทดลอง

(3) การเพิ่มสารอนินทรีย์คือการเพิ่มเพื่อให้อนุมูล NH^+_4 $H_2PO^-_4$ K^+ และ NO^-_3 มีปริมาณเท่าเดิมหลังจากลดสารอนินทรีย์ใน (2)

(4) การเติมสารอินทรีย์ เติมสูตรทดลองละอย่าง รวมทั้งหมดได้ 33 สูตรทดลอง

ตารางที่ 3 สูตรทดลองเพื่อทดสอบความต้องการ NO_3^- ในรูปและปริมาณต่างๆ เมื่อใช้สารอินทรีย์แต่ละชนิดเป็นหลัก

สูตร* ทดลอง	สารอินทรีย์ ชนิด	mM	mg/l	สารอินทรีย์(2) กล้วยหอม (g/l)	มันฝรั่ง (g/l)	ปุ๋ยปลา (ml/l)
1	Mod.SH	Mod.SH	Mod.SH(1)	0	0	0
2	Mod.SH	Mod.SH	Mod.SH	150	150	4
3	-	-	-	150	150	4
4	KNO_3	24.75	2,500.0	150	150	4
5	KNO_3	12.38	1,250.0	150	150	4
6	KNO_3	6.19	625.0	150	150	4
7	KNO_3	3.09	312.5	150	150	4
8	KNO_3	1.55	156.3	150	150	4
9	$NaNO_3$	24.75	2,102.5	150	150	4
10	$NaNO_3$	12.38	1,051.3	150	150	4
11	$NaNO_3$	6.19	529.7	150	150	4
12	$NaNO_3$	3.09	262.8	150	150	4
13	$NaNO_3$	1.55	131.4	150	150	4

* สูตรอาหารทดลองในขั้นตอนนี้รวมทั้งหมด 39 สูตรทดลอง

(1) สูตรอาหาร Mod.SH ประกอบด้วยธาตุอาหารหลัก 1/2 SH ธาตุอาหารรองตาม SH ซูโครส 40 g/l, วุ้น 4 g/l. (ยกเว้นสูตรที่เติมปุ๋ยปลาใส่วุ้น 8 g/l)

(2) การเติมสารอินทรีย์ เติมชุดละอย่าง รวมทั้งหมดได้ 39 สูตร

ตารางที่ 4 สูตรทดลองเพื่อทดสอบการขาดธาตุอาหารรองเมื่อใช้สารอินทรีย์เป็นหลัก

สูตร* ทดลอง	ธาตุอาหารหลัก	สารอินทรีย์		ธาตุอาหารรอง(1)	สารอินทรีย์ กล้วยหอม (g/l)	มันฝรั่ง (g/l)	ปุ๋ยปลา (ml/l)
		mM	mg/l				
1	KNO_3	12.38	1,250.0	SH	150	150	4
2	KNO_3	12.38	1,250.0	-	150	150	4
3	$NaNO_3$	12.38	1,051.3	SH	150	150	4
4	$NaNO_3$	12.38	1,051.3	–	150	150	4

* สูตรอาหารทดลองในขั้นตอนนี้รวมทั้งหมด 12 สูตรทดลอง

(1) ธาตุอาหารรองใช้ตาม SH เทียบกับไม่ใส่ (-)

(2) ทุกการทดลองใส่ ซูโครส 40 g/l และ วุ้น 4 g/l (ยกเว้นสูตรที่เติมปุ๋ยปลาใส่วุ้น 8 g/l)

(3) การเติมสารอินทรีย์เติมชุดละอย่าง รวมทั้งหมดได้ 12 สูตร

5. ทดลองใช้สูตรดัดแปลงสารอินทรีย์ เพาะเมล็ด เลี้ยงแคลลัส และชักนำตาจากหน่ออ่อนให้เกิดแคลลัส ใช้น้ำตาลที่ความเข้มข้นต่างกัน

ตารางที่ 5 สูตรที่สร้างขึ้นใหม่ใช้ทดลองเพาะเมล็ด เลี้ยงแคลลัส และชักนำตาจากหน่ออ่อนให้เกิดแคลลัส

สูตร* ทดลอง	สารอินทรีย์(1) ชนิด	mg/l	สารอินทรีย์(3) กล้วยหอม (g/l)	มันฝรั่ง (g/l)	ปุ๋ยปลา (g/l)	ซูโครส (g/l)
1	Mod.SH(2)	Mod.SH	-	-	-	20
2	Mod.SH	Mod.SH	-	-	-	40
3	KNO_3	2,500	150	-	-	20
4	KNO_3	2,500	150	-	-	40
5	KNO_3	2,500	-	150	-	20
6	KNO_3	2,500	-	150	-	40
7	KNO_3	2,500	-	-	4	20
8	KNO_3	2,500	-	-	4	40

* สูตรอาหารทดลองในขั้นตอนนี้รวมทั้งหมด 8 สูตรทดลอง

(1) สูตรเหล่านี้ไม่ใส่ธาตุอาหารรอง

(2) สูตรอาหาร Mod.SH ประกอบด้วยธาตุอาหารหลัก 1/2 SH, วุ้น 4 g/l (ยกเว้นสูตรที่เติมปุ๋ยปลาใส่วุ้น 8 g/l)

(3) การเติมสารอินทรีย์เติมชุดละอย่างรวมทั้งหมดได้ 8 สูตร

เมื่อใช้เลี้ยงแคลลัสและชักนำตาจากหน่ออ่อนให้เกิดแคลลัส เติม NAA 0.5 mg/l และน้ำมะพร้าวอ่อน 100 ml/l

สถิติที่ใช้ในการวิจัย

Completely Randomized Design (CRD) (Gomez and Gomez, 1984)