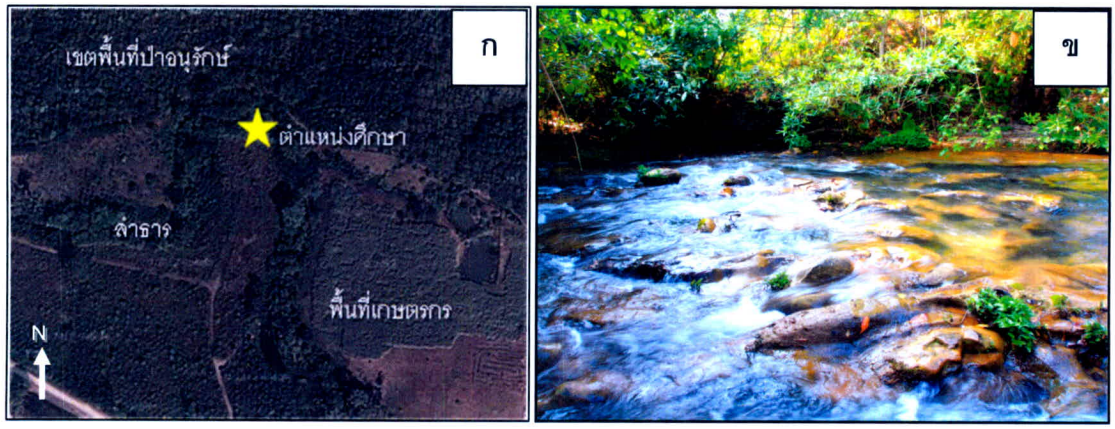
บทที่ 3

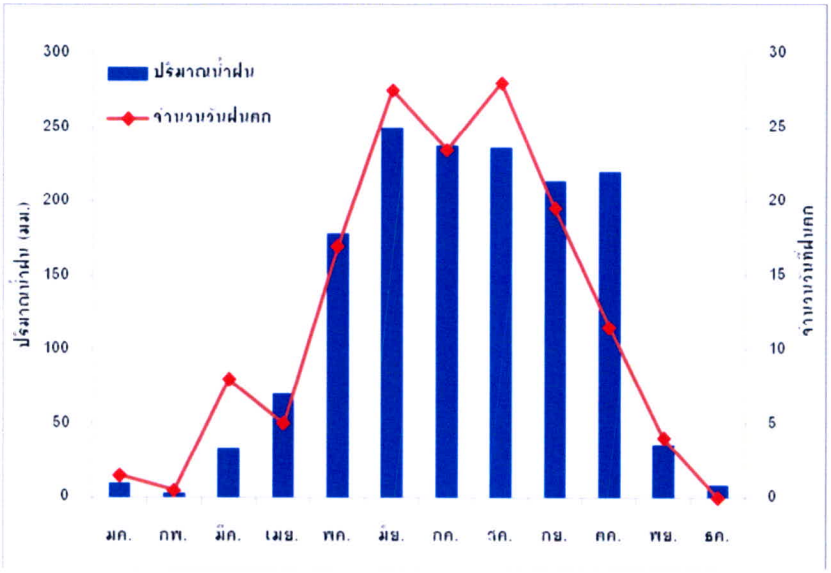
วิธีดำเนินการวิจัย

ตำแหน่งพื้นที่วิจัยในครั้งนี้ เป็นลำธารห้วยแม่ตาว ที่ไหลผ่านเขตพื้นที่ของหมู่บ้านถ้ำเสือ อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก และจากการสำรวจในบริเวณลำธารที่มีกล้วยไม้น้ำกระจายพันธุ์อยู่ พบว่ามีกลุ่มประชากรกล้วยไม้น้ำกระจายพันธุ์เจริญเติบโตอยู่ค่อนข้างหนาแน่น 2 กลุ่มประชากร ซึ่งอยู่ห่างไกลกันเป็นระยะทางประมาณ 300 เมตร โดยกลุ่มประชากรที่ 1 ตั้งอยู่ในตำแหน่งพิกัด 16°40'03.96"N, 98°39'47.92"E ที่ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล 366.5 เมตร และกลุ่มประชากรที่ 2 ตั้งอยู่ในตำแหน่งพิกัด 16°40'02.66"N, 98°39'44.53"E ที่ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล 356.0 เมตร ซึ่งต้นกล้วยไม้น้ำจะเจริญเติบโตอยู่บนโขดหินปูนที่มีน้ำไหลผ่านตลอดเวลา สภาพแวดล้อมทั่วไปของพื้นที่ในช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2554 ถึงมกราคม พ.ศ. 2555 มีความชื้นในอากาศประมาณ 26-90 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิอากาศอยู่ในช่วง 26-38 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของน้ำในลำธารอยู่ระหว่าง 24-25 องศาเซลเซียส น้ำในลำธารมีสภาพเป็นด่าง (Alkalinity) เล็กน้อย (pH 8.0-8.5) อาจเนื่องจากโครงสร้างทางกายภาพของลำธารที่ประกอบไปด้วยก้อนหินลักษณะเป็นหินปูนกระจายอยู่ทั่วไปในลำธาร (ภาพ 1) และมีปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยของพื้นที่อำเภอแม่สอด แตกต่างกันไปในแต่ละเดือน (ภาพ 2)



ภาพ 1 ภาพถ่ายทางอากาศของพื้นที่ทำการวิจัยบริเวณพื้นที่ของบ้านถ้ำเสือ (ก) และโครงสร้างทั่วไปทางกายภาพของลำธารที่กล้วยไม้น้ำเจริญเติบโต (ข)

ที่มา: https://maps.google.co.th/ (ก); ภาพจากคุณธนากร วงษศา (ข)



ภาพ 2 ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยของพื้นที่อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก ตั้งแต่ปี พ.ศ.2551 ถึง พ.ศ.2555

ที่มา: สถานีอุตุนิยมวิทยาแม่สอด กรมอุตุนิยมวิทยา

สำหรับรูปแบบการศึกษาชีววิทยาและการขยายพันธุ์กล้วยไม้น้ำ (*Epipactis flava* Seidenf.) แบ่งออกเป็น 1) การสำรวจและรวบรวมข้อมูลบางประการทางชีววิทยาของกล้วยไม้น้ำ และ 2) การเพาะเลี้ยงกล้วยไม้น้ำในสภาพปลอดเชื้อ รวมไปถึง 3) การออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกหลอดทดลอง ซึ่งมีรายละเอียดในแต่ละหัวข้อดังนี้

สำรวจและรวบรวมข้อมูลบางประการทางชีววิทยาของกล้วยไม้น้ำ

สำรวจและเก็บรวบรวมข้อมูลบางประการทางชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับชีพลักษณ์และลักษณะการเจริญเติบโตของกล้วยไม้น้ำภายในพื้นที่ บันทึกข้อมูลต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาการทางด้านการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์เป็นเบื้องต้น และรูปแบบการผสมเกสรต่อพัฒนาการของฝักกล้วยไม้น้ำ รวมไปถึงเก็บตัวอย่างโครงสร้างของส่วนต่างๆ เพื่อศึกษาโครงสร้างทางกายวิภาคโดยการตัดตามขวาง ซึ่งในแต่ละหัวข้อจะดำเนินการศึกษาทดลองดังต่อไปนี้

1. **การศึกษาชีพลักษณ์**

บันทึกรูปแบบลักษณะการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้น้ำที่เกิดขึ้นตามลักษณะการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม รวมไปถึงพัฒนาการในระยะสืบพันธุ์ของกล้วยไม้น้ำเป็นเบื้องต้นในทุกๆ เดือน ตั้งแต่เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2554 ถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2555 โดยสำรวจและจดบันทึกข้อมูลในรูปแบบของการบรรยาย

2. **การเจริญเติบโตทางลำต้นและพัฒนาการระยะสืบพันธุ์**

การกระจายพันธุ์ของต้นกล้วยไม้น้ำในธรรมชาติจะเกาะและเจริญเติบโตบนโขดหินปูนที่มีกระแสน้ำไหลผ่าน จากการสังเกตพบว่า กอกล้วยไม้น้ำที่ได้รับปริมาณความเข้มแสงในรอบวันแตกต่างกัน จะมีลักษณะการเจริญเติบโตและพัฒนาการทั้งทางด้านลำต้น รวมถึงในระยะสืบพันธุ์ที่แตกต่างกันด้วย ทำการคัดเลือกกอกล้วยไม้น้ำที่เจริญเติบโตในบริเวณที่ได้รับความเข้มแสงแตกต่างกัน ซึ่งวัดจากเครื่องวัดความเข้มแสงสว่าง (Photometer, Model LI-250 Light Meter) โดยกำหนดกอกล้วยไม้น้ำที่เจริญอยู่ในที่ได้รับแสงตลอดทั้งวัน และกอที่เจริญอยู่ในที่ร่มเงา ดังนี้

กอที่เจริญกลางแจ้ง จำนวน 3 กอ ที่เจริญอยู่ในบริเวณพื้นที่ที่ได้รับความเข้มแสงเฉลี่ย ทั้งช่วงเช้าและบ่าย มากกว่า 350 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$

กอที่เจริญในร่มเงา จำนวน 3 กอ ที่เจริญอยู่ในบริเวณพื้นที่ที่ได้รับความเข้มแสงเฉลี่ย ทั้งช่วงเช้าและบ่าย น้อยกว่า 350 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$

บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตและการพัฒนาทางด้านลำต้นของกล้วยไม้น้ำ โดยสุ่มวัดความสูงของลำต้น ขนาดของลำต้น จำนวนใบ (n=30 ต้นต่อกอ) และพื้นที่แผ่นใบเฉลี่ย (n=5 ใบต่อกอ) (ใบตำแหน่งที่ 4 นับจากปลายยอด) รวมไปถึง จำนวนช่อดอกที่สร้างขึ้นต่อจำนวนต้นกล้วยไม้น้ำที่เกิดขึ้นทั้งหมดในกอ (กอกลางแจ้งจำนวน 3 กอ n=1488 ต้น และ กอในร่มจำนวน 3 กอ (n=1661 ต้น) (ที่มีความสูงมากกว่า 10 เซนติเมตร) บันทึกข้อมูลเป็นเปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างโดยวิธี Duncan multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรม SPSS ver.11.5

3. การศึกษารูปแบบการผสมเกสรต่อพัฒนาการของฝัก

เมื่อต้นกล้วยไม้น้ำในธรรมชาติเริ่มมีการสร้างช่อดอก คัดเลือกช่อดอกที่สมบูรณ์และไม่มีการเข้าทำลายของโรคและแมลง จากนั้นทำการครอบช่อดอกด้วยถุงตาข่ายพลาสติกตาถี่ขนาดความกว้าง 15 x 30 เซนติเมตร เพื่อป้องกันแมลงผสมเกสรและแมลงศัตรูพืช (ภาพ 3) เมื่อดอกบาน จึงผสมเกสรดอกกล้วยไม้ด้วยมือ โดยแบ่งรูปแบบของการผสมออกเป็น 2 รูปแบบ ได้แก่

3.1 ผสมเกสรภายในดอกตัวเอง (Self pollination) โดยนำกลุ่มอับเรณู (Pollinia) วางลงบนยอดของเกสรเพศเมียภายในดอกเดียวกัน หลังจากนั้นครอบช่อดอกไว้เหมือนเดิม (n=30 ดอก)

3.2 ผสมเกสรข้ามดอก (Cross pollination) โดยนำกลุ่มอับเรณูภายในดอกออก จากนั้นนำเอาอับเรณูจากดอกกล้วยไม้น้ำต้นอื่นมาวางลงบนยอดของเกสรเพศเมีย หลังจากนั้นครอบช่อดอกไว้เหมือนเดิม (n=30 ดอก)

บันทึกขนาดความกว้างและความยาวของฝักกล้วยไม้น้ำที่เกิดการเปลี่ยนแปลงในทุกสัปดาห์ (n=15 ฝักต่อรูปแบบผสมเกสร) จนฝักกล้วยไม้น้ำแก่และแตกออกตามธรรมชาติ

ภาพ 3 ลักษณะการครอบช่อดอกกล้วยไม้น้ำด้วยตาข่ายพลาสติก

4. การศึกษาทางกายวิภาค

เก็บตัวอย่างโครงสร้างส่วนต่างๆ ของกล้วยไม้น้ำที่มีลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง ไม่มีการเข้าทำลายของโรคและแมลง มาศึกษาลักษณะโครงสร้างทางกายวิภาคของ ราก เหง้า (Rhizome) ลำต้น ใบ ก้านช่อดอก และฝัก โดยการตัดตามขวางตามวิธีการทางไมโครเทคนิค (Microtechnique) ด้วยเทคนิคพาราฟิน (Paraffin method) ที่ดัดแปลงจากวิธีการของ อัจฉรา ธรรมถาวร (2538) บันทึกรูปภาพและบรรยายลักษณะโครงสร้างทางกายวิภาคของส่วนต่างๆ

การเพาะเลี้ยงกล้วยไม้น้ำในสภาพปลอดเชื้อ

การเพาะเลี้ยงกล้วยไม้น้ำในสภาพปลอดเชื้อ จะแบ่งการศึกษาออกเป็น การเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้น้ำในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อศึกษากระบวนการงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์ม รวมไปถึงการศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการทวีจำนวนของหน่ออ่อนกล้วยไม้น้ำในหลอดทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

1. การศึกษาการงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์ม

เมื่อฝักกล้วยไม้น้ำมีอายุ 2 4 6 และ 8 สัปดาห์ หลังจากได้รับการผสมเกสรภายในดอกเดียวกัน หรือที่ได้รับการผสมเกสรข้ามดอก จึงเก็บฝักกล้วยไม้น้ำที่มีอายุฝักแตกต่างกันในแต่ละรูปแบบการผสมเกสร (n=5 ฝักต่ออายุฝักและรูปแบบผสมเกสร) นำเมล็ดที่อยู่ภายในฝักมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

การฟอกฆ่าเชื้อฝัก

นำฝักกล้วยไม้น้ำที่เก็บมาฟอกฆ่าเชื้อผิวฝักด้วยสารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) โซเดียมไฮโปรคลอไรท์ (Sodium hypochlorite) ที่ผสมด้วย น้ำยาล้างจาน (Sunlight®) 1-2 หยด เพื่อลดแรงตึงผิว และเพิ่มประสิทธิภาพในการฟอกฆ่าเชื้อ เขย่าเบาๆ ปล่อยทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นล้างสารฟอกฆ่าเชื้อออก 2-3 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ นำฝักไปผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวอีกครั้งด้วยการจุ่มในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ นำไปลนไฟ ทุกขั้นตอนทำภายในตู้ปลอดเชื้อ (Laminar airflow cabinet : ABS 1800A)

การเพาะเลี้ยง

ผ่าฝักที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยมีดผ่าตัด นำเมล็ดที่อยู่ภายใน (ประมาณ 80-100 เมล็ด) โรยลงบนผิวหน้าของอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็งสูตร Vacin and Went (VW) (1949) ที่ดัดแปลงโดยการเติมน้ำมะพร้าวอ่อน 150 มิลลิลิตร ร่วมกับน้ำต้มมันฝรั่ง 50 กรัม (ต้มรวมกับน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) น้ำตาลทราย 20 กรัม ผงวุ้น (Pearl Mermaid®) 7 กรัม ต่อปริมาตรอาหาร

เพาะเลี้ยงหนึ่งลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ของอาหารเพาะเลี้ยงเป็น 5.2 ก่อนนำไปผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave; KT 40L) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เพาะเลี้ยงเมล็ดจำนวน 15 จานเพาะเลี้ยงต่อรูปแบบการผสมเกสรและอายุฝักที่แตกต่างกัน นำไปเพาะเลี้ยงไว้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส โดยไม่ให้ได้รับแสงสว่าง

เมื่อเวลาผ่านไป 10 สัปดาห์ บันทึกรูปแบบพัฒนาการงอกและการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานของเมล็ดกล้วยไม้น้ำ โดยดัดแปลงรูปแบบดังกล่าวมาจากรูปแบบการงอกและการพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้ดิน (Stewart and Zettler, 2002) (ตาราง 1 และ ภาพ 4) สุ่มนับเมล็ดกล้วยไม้น้ำ 100 เมล็ดต่อจานเพาะเลี้ยง นับซ้ำจำนวน 5 ครั้งต่ออายุฝักและรูปแบบผสมเกสรด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereomicroscope) นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การงอกตามสูตรด้านล่าง

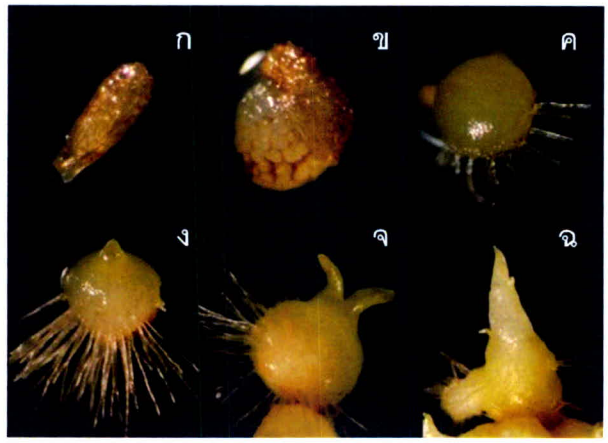
เปอร์เซ็นต์การงอก = [(c+d+e+f) / (a+b+c+d+e+f)] 100

เมื่อ a หมายถึง จำนวนของเมล็ดที่อยู่ในระยะพัฒนาที่ 0
b หมายถึง จำนวนของเมล็ดที่อยู่ในระยะพัฒนาที่ I
c หมายถึง จำนวนของเมล็ดที่อยู่ในระยะพัฒนาที่ II
d หมายถึง จำนวนของเมล็ดที่อยู่ในระยะพัฒนาที่ III
e หมายถึง จำนวนของเมล็ดที่อยู่ในระยะพัฒนาที่ IV
f หมายถึง จำนวนของเมล็ดที่อยู่ในระยะพัฒนาที่ V

จากนั้นนำข้อมูลไปวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธีการ Duncan multiple range test ด้วยโปรแกรม SPSS ver.11.5

ตาราง 1 รูปแบบการงอกและการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานของเมล็ดกล้วยไม้น้ำ (ดัดแปลงจาก Stewart and Zettler, 2002)

ระยะพัฒนาที่	พัฒนาการ และการเปลี่ยนแปลง
O	เอมบริโอมีชีวิตแต่ไม่เกิดการงอก
I	เอมบริโอขยายขนาดเพิ่มขึ้น หรือหลุดออกจากเปลือกหุ้มเมล็ด (Testa)
II	เอมบริโอขยายขนาดต่อเนื่อง และปรากฏส่วนของไรซอยด์ (Rhizoids) (ระยะที่เมล็ดเกิดการงอก)
III	ปรากฏเนื้อเยื่อเจริญบริเวณด้านตรงข้ามกับส่วนของไรซอยด์
IV	ปรากฏใบแรกออกมา หรือปรากฏส่วนของใบอ่อน
V	ใบแรกเกิดการยืดยาวออก และเกิดรากขึ้น



ภาพ 4 การพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานของเมล็ดกล้วยไม้น้ำ ระยะพัฒนาที่ 0 (ก), ระยะพัฒนาที่ I (ข), ระยะพัฒนาที่ II (ค), ระยะพัฒนาที่ III (ง), ระยะพัฒนาที่ IV (จ) และระยะพัฒนาที่ V (ฉ)

2. การศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการทวีจำนวนของหน่ออ่อนกล้วยไม้น้ำในหลอดทดลอง

เมื่อเมล็ดกล้วยไม้น้ำเกิดการงอกและเจริญเติบโตไปเป็นต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ นำต้นอ่อนที่ได้มาใช้เป็นวัสดุเริ่มต้นในการศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการทวีจำนวนของหน่ออ่อนกล้วยไม้น้ำในหลอดทดลอง โดยแบ่งปัจจัยต่างๆ ที่ศึกษาดังนี้

2.1 อัตราส่วนของสารประกอบอนินทรีย์บางชนิด

คัดเลือกต้นอ่อนกล้วยไม้น้ำอายุ 14-15 สัปดาห์ หลังจากเพาะเมล็ด โดยกำหนดให้ต้นอ่อนที่เลือกมามีจำนวนหน่ออ่อน ใบ และรากต่อต้นเท่ากัน นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่มีอัตราส่วนของสารประกอบอนินทรีย์บางชนิดแตกต่างกัน ได้แก่ สูตรอาหาร Vacin and Went (VW) 1949, Murashige and Skoog (MS) 1962, BM-1 Terrestrial Orchid Medium (BM-1) และ Malmgren Modified Terrestrial Orchid Medium (MM) 1996 (ตาราง 2) ซึ่งจะมีเฉพาะสูตรอาหาร VW (1949) ที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 150 มิลลิลิตร ร่วมกับน้ำต้มมันฝรั่ง 50 กรัม (ต้มรวมกับน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) รวมไปถึงอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งสูตร ได้แก่ สูตรอาหาร ½VW, ½MS, ½BM-1 และ ½MM เพื่อศึกษาผลของสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเพิ่มจำนวนหน่ออ่อนกล้วยไม้น้ำในหลอดทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มโดยตลอด (Complete Randomized Design) โดยเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้น้ำจำนวน 10 ต้นต่อจานเพาะเลี้ยง (Hycon 90x15 mm) ที่มีปริมาตรอาหาร 25 มิลลิลิตร ทำซ้ำจำนวน 10 จานเพาะเลี้ยงต่อสูตรอาหาร หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงไว้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และให้ได้รับแสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ที่ความเข้มแสง 20 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน

สังเกตและบันทึกผลการเจริญเติบโต โดยบันทึกจำนวนหน่อ ใบ ราก และอัตราการรอดชีวิตของต้นอ่อนกล้วยไม้น้ำ รวมไปถึงลักษณะทางสัณฐานของต้นอ่อนกล้วยไม้น้ำที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อระยะเวลาเพาะเลี้ยงผ่านไป 9 สัปดาห์ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี Duncan multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรม SPSS ver.11.5

ตาราง 2 องค์ประกอบของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้น้ำ

สาร	สูตรเคมี	สูตรอาหาร (mg/l)			
		VW	MS	BM-1*	MM*
Ammonium nitrate	NH_4NO_3		1,650		
Ammonium sulfate	$(NH_4)_2SO_4$	500			
Magnesium sulfate	$MgSO_4.7H_2O$	250	370	100	97.687
Manganese sulfate	$MnSO_4.4H_2O$	7.5	6.9	25	1.54
Calcium chloride	$CaCl_2.2H_2O$		440		
Calcium phosphate	$Ca_3(PO_4)_2$	200			75
Potassium nitrate	KNO_3	525	1900		
Potassium phosphate	KH_2PO_4	250	170	300	75
Potassium iodide	KI		0.83		
Sodium molybdate	$Na_2MoO_4.2H_2O$		0.25	0.25	
Sodium chelating agent	$Na_2EDTA\ 2H_20$	37.3	37.3	37.25	37.26
Ferrous sulfate	$FeSO_4.7H_2O$	27.8	27.8	27.85	27.8
Zinc sulfate	$ZnSO_4.H_2O$		6.14	10	
Copper sulfate	$CuSO_4.5H_2O$		0.025	0.025	
Cobaltous chloride	$CoCl_2.6H_20$		0.025	0.025	
Boric acid	H_3BO_3		6.2	10	
L-Glutamine				100	
Glycine			2.0	2.0	2.0
Casein				500	400
D-Biotin (S)				0.05	0.05
Folic acid (M)				0.5	0.5
Thiamine hydrochloride (B1)			0.1	0.5	10
Nicotinic acid (B3)			0.5	5.0	5.0
Pyridoxine hydrochloride (B6)			0.5	0.5	5.0
Myo-Inositol			100	100	100
Activated Charcoal					1000
Sucrose		20,000	30,000	20,000	20,000
Agar		7000	7000	7000	7000
pH		5.2	5.8	5.5	5.75

หมายเหตุ: *อาหารสูตร BM-1 และ สูตร MM เป็นอาหารสำเร็จรูปของบริษัท *Phyto*Technology

2.2 ระยะเวลาการได้รับแสงในรอบวัน

คัดเลือกต้นอ่อนกล้วยไม้น้ำที่อายุ 14-15 สัปดาห์ หลังจากเพาะเมล็ด โดยกำหนดให้ต้นอ่อนที่เลือกมามีจำนวนหน่ออ่อน ใบ และรากต่อต้นเท่ากัน ศึกษาผลของระยะเวลาการได้รับแสงสว่างในรอบวันต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของต้นอ่อน โดยเพาะเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้น้ำลงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร VW (1949) ที่ดัดแปลงเติมน้ำมะพร้าวอ่อน 150 มิลลิลิตร ร่วมกับน้ำต้มมันฝรั่ง 50 กรัม (ต้มรวมกับน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) น้ำตาลทราย 20 กรัม ผงวุ้น 7 กรัม ต่อปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยงหนึ่งลิตร วางแผนการทดลองแบบสุ่มโดยตลอด (Complete Randomized Design) เพาะต้นอ่อนจำนวน 10 ต้นต่อจานเพาะเลี้ยง (Hycon 90x15 mm) ที่มีปริมาตรอาหาร 25 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงไว้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ที่ระดับความเข้มแสง 20 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ โดยแบ่งต้นอ่อนกล้วยไม้น้ำได้รับแสงแตกต่างกันดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้รับแสงสว่างเป็นเวลา 6 ชั่วโมงต่อวัน จำนวน 10 จานเพาะเลี้ยง
กลุ่มที่ 2 ได้รับแสงสว่างเป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน จำนวน 10 จานเพาะเลี้ยง
กลุ่มที่ 3 ได้รับแสงสว่างเป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน จำนวน 10 จานเพาะเลี้ยง
กลุ่มที่ 4 ได้รับแสงสว่างเป็นเวลา 24 ชั่วโมงต่อวัน จำนวน 10 จานเพาะเลี้ยง

เมื่อระยะเวลาเพาะเลี้ยงผ่านไป 10 สัปดาห์ สังเกตและบันทึกผลการเจริญเติบโต โดยบันทึกจำนวนหน่อ ใบ และ ราก รวมไปถึงการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานของต้นอ่อนที่เกิดขึ้น จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี Duncan multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรม SPSS ver.11.5

2.3 สภาพความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในอาหารเพาะเลี้ยง

คัดเลือกต้นอ่อนกล้วยไม้น้ำที่อายุ 14-15 สัปดาห์ หลังจากเพาะเมล็ด โดยกำหนดให้ต้นอ่อนที่เลือกมามีจำนวนหน่ออ่อน ใบ และ รากต่อต้นเท่ากัน นำต้นอ่อนดังกล่าวเพาะเลี้ยงลงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร VW (1949) ที่ดัดแปลงเติมน้ำมะพร้าวอ่อน 150 มิลลิลิตร ร่วมกับน้ำต้มมันฝรั่ง 50 กรัม (ต้มรวมกับน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) น้ำตาลทราย 20 กรัม ผงวุ้น 7 กรัม ต่อปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยงหนึ่งลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเพาะเลี้ยงด้วยสารละลาย 1N โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และ 1N ไฮโดรคลอริก (HCl) โดยแปรผันค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเพาะเลี้ยงออกเป็น

สูตรที่ 1 ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 5.0
สูตรที่ 2 ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 5.2
สูตรที่ 3 ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 5.4
สูตรที่ 4 ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 5.6

นำไปตรวจวัดด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (SCHOTT: Lab 850) ก่อนนำไปผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เพาะเลี้ยงต้นอ่อนจำนวน 3 ต้น ลงในขวดขนาด 2 ออนซ์ ทำซ้ำจำนวน 15 ขวดต่อสูตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงไว้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้ได้รับแสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ระดับความเข้มแสง 20 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน

เมื่อระยะเวลาเพาะเลี้ยงผ่านไป 8 และ 16 สัปดาห์ สังเกตและบันทึกผลการเจริญเติบโต บันทึกจำนวนหน่อ ใบ ราก และ น้ำหนักสด รวมไปถึงการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของต้นอ่อนกล้วยไม้น้ำ นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี Duncan multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรม SPSS ver.11.5

2.4 สารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อน (น้ำมะพร้าวอ่อน และน้ำต้มมันฝรั่ง)

คัดเลือกต้นอ่อนกล้วยไม้น้ำที่อายุ 26-27 สัปดาห์ หลังจากเพาะเมล็ด โดยกำหนดต้นอ่อนที่เลือกมามีจำนวนหน่ออ่อน ใบ และ รากต่อต้นเท่ากัน เพาะเลี้ยงต้นอ่อนลงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร ½VW (1949) ที่ดัดแปลงเติมน้ำมะพร้าวอ่อน ร่วมกับน้ำต้มมันฝรั่ง ในปริมาณแตกต่างกัน ซึ่งอาหารเพาะเลี้ยงสูตรที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 75 มิลลิลิตร ร่วมกับน้ำต้มมันฝรั่ง 25.0 กรัม ต่อปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยงหนึ่งลิตร เป็นสูตรควบคุม (Control) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น

การทดลองน้ำมะพร้าวอ่อน

เพาะเลี้ยงต้นอ่อนลงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร ½VW (1949) ที่ดัดแปลงเติมน้ำต้มมันฝรั่ง 25 กรัมต่อลิตร (ซึ่งก่อนต้มร่วมกับน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) ร่วมกับการแปรผันปริมาณน้ำมะพร้าวอ่อน ได้แก่

สูตรที่ 1 น้ำมะพร้าวอ่อน 50 มิลลิลิตรต่อปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยงหนึ่งลิตร

สูตรที่ 2 น้ำมะพร้าวอ่อน 100 มิลลิลิตรต่อปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยงหนึ่งลิตร

สูตรที่ 3 น้ำมะพร้าวอ่อน 125 มิลลิลิตรต่อปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยงหนึ่งลิตร

การทดลองน้ำต้นมันฝรั่ง

เพาะเลี้ยงต้นอ่อนลงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร ½VW (1949) ที่ดัดแปลงเติมน้ำมะพร้าวอ่อน 75 มิลลิลิตรต่อลิตร ร่วมกับการแปรผันน้ำต้มมันฝรั่ง ที่ชั่งก่อนนำไปต้มร่วมกับน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ได้แก่

สูตรที่ 4 น้ำต้มมันฝรั่ง 12.5 กรัมต่อปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยงหนึ่งลิตร

สูตรที่ 5 น้ำต้มมันฝรั่ง 37.5 กรัมต่อปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยงหนึ่งลิตร

สูตรที่ 6 น้ำต้มมันฝรั่ง 50.0 กรัมต่อปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยงหนึ่งลิตร

อาหารเพาะเลี้ยงทุกสูตรปรับความเป็นกรดด่างเป็น 5.2 ก่อนนำไปผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำต้นอ่อนกล้วยไม้น้ำจำนวน 3 ต้น เพาะลงในขวดขนาด 2 ออนซ์ ทำซ้ำจำนวน 15 ขวดต่อสูตร นำไปเพาะเลี้ยงไว้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้ได้รับแสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ระดับความเข้มแสง 20 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน

เมื่อระยะเวลาเพาะเลี้ยงผ่านไป 4 และ 8 สัปดาห์ สังเกตและบันทึกผลการเจริญเติบโต โดยบันทึกจำนวนหน่อ ใบ ราก และ น้ำหนักสดของต้น รวมไปถึงการเปลี่ยนแปลง

ลักษณะทางสัณฐานของต้นอ่อนที่เกิดขึ้น จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี Duncan multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรม SPSS ver.11.5

2.5 สารควบคุมการเจริญเติบโต

คัดเลือกต้นอ่อนกล้วยไม้น้ำที่อายุ 26-27 สัปดาห์ หลังจากเพาะเมล็ดที่มีจำนวนหน่อ ใบ และ รากต่อต้นเท่ากัน นำไปเพาะเลี้ยงลงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร ½VW (1949) ดัดแปลงเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน (Cytokinins) และออกซิน (Auxins) ที่แปรผันระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น

การทดลองไซโตไคนิน

นำต้นอ่อนกล้วยไม้น้ำเพาะเลี้ยงลงบนอาหารกึ่งแข็งสูตรดังกล่าว ที่เติม 6-benzylaminopurine (BA), Zeatin และ Kinetin แปรผันระดับความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Thidiazuron (TDZ) แปรผันระดับความเข้มข้น 0.1 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองออกซิน

นำต้นอ่อนกล้วยไม้น้ำเพาะเลี้ยงลงบนอาหารกึ่งแข็งสูตรดังกล่าว ที่เติม α-Naphthaleneacetic acid (NAA), Indole-3-acetic acid (IAA), Indole-3-butyric acid (IBA) และ 2-(2,4-dichlorophenoxy) acetic acid (2,4-D) แปรผันระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเพาะเลี้ยงเป็น 5.2 ก่อนนำไปผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เพาะเลี้ยงต้นอ่อนจำนวน 3 ต้น ลงในขวดขนาด 2 ออนซ์ ทำซ้ำจำนวน 20 ขวดต่อชนิดและระดับความเข้มข้น นำไปเพาะเลี้ยงไว้ภายในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ได้รับแสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 20 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน

เมื่อระยะเวลาเพาะเลี้ยงผ่านไป 4 และ 8 สัปดาห์ สังเกตและบันทึกผลจำนวนหน่อ ใบ ราก และ ความสูงของลำต้น รวมไปถึงการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของต้นอ่อนกล้วยไม้น้ำที่เกิดขึ้น จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี Duncan multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรม SPSS ver.11.5

2.6 สถานะอาหารเพาะเลี้ยง

นำต้นอ่อนกล้วยไม้น้ำที่อายุ 37 สัปดาห์ หลังจากเพาะเมล็ด คัดเลือกต้นอ่อนที่มีจำนวนหน่ออ่อน ใบ และ รากต่อต้นเท่ากัน เพาะลงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร ½VW (1949) ที่ดัดแปลงเติมน้ำมะพร้าวอ่อน 75 มิลลิลิตร ร่วมกับน้ำต้มมันฝรั่ง 25.0 กรัม และ น้ำตาลทราย 20 กรัมต่อปริมาณอาหารเพาะเลี้ยงหนึ่งลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเป็น 5.2 จากนั้นทำให้อาหารเพาะเลี้ยงดังกล่าวมีสถานะแตกต่างกัน ดังนี้

สถานะที่ 1 อาหารกึ่งแข็ง (Semi-solid medium) โดยใช้ผงวุ้น 7 กรัมต่อปริมาตรอาหารหนึ่งลิตร บรรจุอาหารประมาณ 20 มิลลิลิตรต่อขวดเพาะเลี้ยงขนาด 4 ออนซ์

สถานะที่ 2 อาหารเหลว (Liquid medium) จะไม่เติมผงวุ้น โดยบรรจุปริมาตรอาหาร 20 มิลลิลิตรต่อขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask) ขนาด 50 มิลลิลิตร

สถานะที่ 3 อาหารสองสถานะ (Dual-phase medium) โดยบรรจุอาหารกึ่งแข็งลงในขวดขนาด 4 ออนซ์ จากนั้นเติมอาหารเหลวปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าของอาหารกึ่งแข็ง

เพาะเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้น้ำจำนวน 2 ต้นต่อสถานะอาหารเพาะเลี้ยง ทำซ้ำจำนวน 15 ซ้ำ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงไว้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้ได้รับแสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ที่ระดับความเข้มแสง 20 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน โดยอาหารเหลวจะเพาะเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที

เมื่อระยะเวลาเพาะเลี้ยงผ่านไป 4 และ 8 สัปดาห์ สังเกตและบันทึกผลจำนวนหน่อ ใบ ราก และ ความสูงของลำต้นที่เกิดขึ้น รวมไปถึงการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของต้นอ่อนกล้วยไม้น้ำ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี Duncan multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรม SPSS ver.11.5

3. การออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกหลอดทดลอง

ต้นกล้วยไม้น้ำที่ได้จากการทดลองต่างๆ ที่มีการเจริญและพัฒนาเต็มที่ในหลอดทดลอง และขยายขนาดเพิ่มมากขึ้น จะนำออกปลูกในสภาวะแวดล้อมภายนอกหลอดทดลอง เพื่อศึกษาผลของวัสดุปลูกต่อการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของต้นกล้วยไม้น้ำ โดยคัดเลือกกอกล้วยไม้น้ำที่มีขนาดความกว้างและความยาวแตกต่างกัน ได้แก่ กอขนาดใหญ่ (1.60-2.00 เซนติเมตร) (n=30) กอขนาดกลาง (1.25-1.60 เซนติเมตร) (n=90) และกอขนาดเล็ก (0.91-1.22 เซนติเมตร) (n=90) ปลูกต้นกล้วยไม้น้ำ จำนวน 5 ต้นต่อกระถางพลาสติก (7x7 เซนติเมตร) ที่บรรจุวัสดุปลูกแตกต่างกัน ได้แก่ เม็ดดินเผา (Hydro clay 0.5-1.0 เซนติเมตร) หินภูเขาไฟ (Pumice 1.0-1.5 เซนติเมตร) และ เม็ดดินเผาผสมรวมกับเม็ดหินภูเขาไฟ (1: 1) นำไปไว้ในภาชนะปิด ภายในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้น้ำด้วยวิธีสเปรย์เป็นหมอก อาทิตย์ละ 2 ครั้ง และให้ได้รับแสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ที่ความเข้มแสง 20 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ นาน 12 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 9 สัปดาห์ เพื่อปรับสภาพต้นกล้วยไม้น้ำ หลังจากนั้น ย้ายออกไปเลี้ยงในโรงเรือนเพาะชำ (Nursery) ที่มีหลังคาพลางแสงแดดผ่านได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ให้น้ำวันละ 2 ครั้ง เลี้ยงต่อไปอีกเป็นเวลา 14 สัปดาห์ สังเกตและบันทึกอัตราการรอดชีวิต รวมไปถึงการสร้างหน่อขึ้นใหม่ของกอกล้วยไม้น้ำที่ออกปลูก