บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

การทดลองที่ 1 การเพาะเมล็ดกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิด(*Aerides odorata* Lour.)

นำฝักกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิด ที่มีอายุฝัก 6 เดือน มาทำความสะอาดโดยตัดส่วนหัวและส่วนปลายของฝักกล้วยไม้ออกเล็กน้อย ระวังไม่ให้ฝักกล้วยไม้แตก จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของฝักโดยแช่ในสารละลายแคลเซียมไฮเปอร์คลอไรด์ ความเข้มข้น 1% เขย่าเป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง เมื่อทำการฆ่าเชื้อที่ผิวรอบนอกของฝักแล้วขั้นตอนการผ่าฝักกล้วยไม้อาจผ่าตามแนวยาวหรือตามแนวขวางก็ได้ขึ้นอยู่ความถนัดของผู้ทำการทดลอง และลักษณะของฝักกล้วยไม้ จากนั้นใช้ปากคีบเคาะหรือคีบเมล็ดกล้วยไม้ลงในอาหารสังเคราะห์สูตร ND (1993) ดัดแปลงที่มีน้ำตาลซูโครส 1% (w/v) และน้ำต้มมันฝรั่ง 1% (w/v) เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2°C ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 40 μmol $m^{-2}s^{-1}$ เมื่อเมล็ดเริ่มงอกจะสังเกตเห็นเมล็ดมีสีเขียว เพาะเลี้ยงต่อไปจนกระทั่งเมล็ดเจริญเป็นโปรโทคอร์ม

การทดลองที่ 2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ต่อการชักนำให้โพรโทคอร์มกุหลาบกระเป๋าปิดเจริญเป็นต้น

เพาะเลี้ยงโพรโทคอร์มกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิด ขนาด 2-3 มม. บนอาหารสังเคราะห์สูตร New Dogashima (ND) ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0 0.1 0.5 และ 1 มก./ล. ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0 1 2 และ 4 มก./ล. ตามลำดับ รวมทั้งหมด 16 สูตร (ตารางที่ 1) เพื่อเปรียบเทียบผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเจริญ และการชักนำให้โปรโทคอร์มกล้วยไม้เจริญเป็นต้น เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2°C ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 40 μmol $m^{-2}s^{-1}$ บันทึกเปอร์เซ็นต์รอดชีวิต นับจำนวนต้นใหม่ เปอร์เซ็นต์การเกิดราก นับจำนวนราก และวัดความสูงต้น เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์

จากนั้นย้ายต้นอ่อนกล้วยไม้ที่ชักนำได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ND ดัดแปลงที่เติมวิตามินและกรดอะมิโนตามสูตรอาหาร MS เพื่อให้ต้นอ่อนกล้วยไม้เจริญต่อไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ก่อนย้ายลงปลูกในกระถางที่มีเปลือกมะพร้าวบรรจุอยู่ ศึกษาอัตราการรอดชีวิตของต้นอ่อนกล้วยไม้ภายหลังออกปลูกในกระถางเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ตารางที่ 1 อาหารสังเคราะห์สูตร ND ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ความเข้มข้นระดับต่างๆ เพื่อชักนำให้โพรโทคอร์มกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดเจริญเป็นต้น

สูตรอาหาร	อาหารสังเคราะห์สูตร ND ที่เติม	
	NAA (มก./ล.)	BA (มก./ล.)
1	0	0
2	0.1	0
3	0.5	0
4	1	0
5	0	1
6	0.1	1
7	0.5	1
8	1	1
9	0	2
10	0.1	2
11	0.5	2
12	1	2
13	0	4
14	0.1	4
15	0.5	4
16	1	4

สถิติที่ใช้ในการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design, CRD) สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล ได้แก่ สถิติพื้นฐาน (ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ร้อยละ) สถิติในการวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย 2 ชุด (T-test) และสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์หาความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (one-way ANOVA)

การทดลองที่ 3 การเก็บรักษาเมล็ดกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง

การเพาะเมล็ดกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิด

นำฝักกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าเปิด ที่มีอายุฝัก 6 เดือน มาทำความสะอาดโดยตัดส่วนหัวและส่วนปลายของฝักกล้วยไม้ออกเล็กน้อย ระวังไม่ให้ฝักกล้วยไม้แตก จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของฝัก โดยแช่ในสารละลายแคลเซียมไฮเปอร์คลอไรต์ ความเข้มข้น 1% เขย่าเป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นผ่าฝักกล้วยไม้ออกตามแนวยาว ใช้ปากคีบเคาะหรือคีบเมล็ดกล้วยไม้ลงในอาหารสังเคราะห์สูตร ND ดัดแปลงที่มีน้ำตาลซูโครส 1% (w/v) และน้ำต้มมันฝรั่ง 1% (w/v) เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2°C ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 40 µmol $m^{-2}s^{-1}$ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.1 การเก็บรักษาเมล็ดที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งโดยการแช่ในไนโตรเจนโดยตรง

นำเมล็ดกล้วยไม้จากการทดลองข้างต้น ใส่ลงในหลอด cryotube ขนาด 2 มล. และนำไปเก็บในไนโตรเจนเหลวอย่างน้อย 1 วัน จากนั้นนำหลอด cryotube มาทำละลายอย่างรวดเร็วโดยแช่ในน้ำที่มีอุณหภูมิประมาณ 40°C เป็นเวลา 2-3 นาที แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ND ดัดแปลงที่มีน้ำตาลซูโครส 1% (w/v) และน้ำต้มมันฝรั่ง 1% (w/v) เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2°C ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 40 µmol $m^{-2}s^{-1}$ เพาะเลี้ยงจนกระทั่งเมล็ดเริ่มงอกและเจริญเป็นโพรโทคอร์ม บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตและการเจริญของเมล็ดภายหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

3.2 การเก็บรักษาเมล็ดที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งโดยวิธี encapsulation-dehydration

นำเมล็ดกล้วยไม้ที่ได้จากการทดลองข้างต้น มาผลิตเป็นเมล็ดเทียม ซึ่งเตรียมโดยใช้อาหารเหลวสูตร ND ที่เติม sodium alginate 3% จากนั้นทำให้แข็งโดยหยดลงในอาหารเหลวสูตร ND ที่เติม $CaCl_2$ 100 mM เขย่าเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 25±2°C นำเมล็ดเทียมที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ND ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.5 M เขย่าเป็นเวลา 18 ชั่วโมง (100 rpm) ที่อุณหภูมิ 25±2°C จากนั้นทำการดึงน้ำออกจากเมล็ดเทียมโดยการผึ่งเมล็ดเทียมลงบนกระดาษกรองปลอดเชื้อและใช้ลมจากตู้ laminar air-flow เป็นเวลา 0-6 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเมล็ดเทียมใส่ลงในหลอด cryotube แล้วนำไปเก็บลงในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 วัน จากนั้นจึงนำมาทำละลายอย่างรวดเร็วโดยแช่ลงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 2-3 นาที แล้วจึงนำไปเมล็ดเทียมไปแช่ลงในอาหารเหลวสูตร ND ที่เติมน้ำตาลซูโครส 1.2 M เป็นเวลา 20 นาที และนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ND ดัดแปลงที่มีน้ำตาลซูโครส 1% (w/v) และน้ำต้มมันฝรั่ง 1% (w/v) เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2°C ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 40 µmol $m^{-2}s^{-1}$

บันทึกปริมาณน้ำที่เหลือภายในเมล็ดเทียมภายหลังจากการดึงน้ำออกเป็นเวลา 0-6 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และการเจริญของเมล็ดภายหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการเก็บที่ไนโตรเจนเหลว

การทดลองที่ 4 การเก็บรักษาโพรโทคอร์มกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง

4.1 การเก็บรักษาโพรโทคอร์มที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งโดยวิธี vitrification

นำโพรโทคอร์มกล้วยไม้ที่เจริญจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสังเคราะห์สูตร ND ดัดแปลงที่มีน้ำตาลซูโครส 1% (w/v) และน้ำต้มมันฝรั่ง 1% (w/v) เป็นเวลา 30 วัน มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ND ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.5 M เขย่าเป็นเวลา 18 ชั่วโมง (100 rpm) ที่อุณหภูมิ 25±2°C จากนั้นใส่ลงในหลอด cryotube ขนาด 2 มล. ที่มีสารละลาย LS 1.5 มล. และไม่มีสารละลาย LS แช่โพรโทคอร์มเป็นเวลานาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 25±2°C จากนั้นเทสารละลาย LS ออก แล้วเติมสารละลาย PVS2 ลงไป เพื่อดึงน้ำออกจากโพรโทคอร์ม โดยแปรผันระยะเวลาในการแช่สาร (0-180 นาที) ที่อุณหภูมิ 0°C เมื่อครบระยะเวลาจึงนำหลอด cryotube เก็บลงในไนโตรเจนเหลวอย่างรวดเร็ว ภายหลังจากการเก็บในไนโตรเจนเหลว นำหลอด cryotube มาทำละลายโดยแช่ในน้ำที่มีอุณหภูมิประมาณ 40°C เป็นเวลา 2-3 นาที เทสารละลาย PVS2 ออก นำโพรโทคอร์มแช่ในอาหารเหลวสูตร ND ที่เติมน้ำตาลซูโครส 1.2 M เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 25±2°C แล้วจึงนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ND ดัดแปลงที่มีน้ำตาลซูโครส 1% (w/v) และน้ำต้มมันฝรั่ง 1% (w/v) เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2°C ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 40 $\mu mol\ m^{-2} s^{-1}$

บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของโพรโทคอร์มภายหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ผ่านการบ่มร่วมกับสารละลาย LS เป็นเวลา 30 นาที และกลุ่มที่ไม่ผ่านการบ่มร่วมกับสารละลาย LS กับกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการเก็บที่ไนโตรเจนเหลว จากนั้นจึงย้ายโปรโทคอร์มมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตต่อไป

4.2 การเก็บรักษาโพรโทคอร์มที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งโดยวิธี encapsulation-dehydration

นำโพรโทคอร์มกล้วยไม้ที่เจริญจากการเพาะเลี้ยงเมล็ด เป็นเวลา 30 วัน มาผลิตเป็นเมล็ดเทียม ซึ่งเตรียมโดยใช้อาหารเหลว ND ที่เติม sodium alginate 3% จากนั้นทำให้แข็งโดยหยดลงในอาหารเหลว ND ที่เติม $CaCl_2$ 100 mM เขย่าเป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 25±2°C นำเมล็ดเทียมที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ND ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.5 M เขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (100 rpm) ที่อุณหภูมิ 25±2°C จากนั้นทำการดึงน้ำออกจากเมล็ดเทียมโดยการผึ่งเมล็ดเทียมลงบนกระดาษกรองปลอดเชื้อและใช้ลมจากตู้ lamina air-flow เป็นเวลา 0-8 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเมล็ดเทียมใส่ลงในหลอด cryotube แล้วนำไปเก็บลงในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 วัน จากนั้นจึงนำมาทำละลายอย่างรวดเร็วโดยแช่ลงในน้ำที่มีอุณหภูมิ40°C เป็นเวลา 2-3 นาที แล้วจึงนำเมล็ดเทียมไปแช่ลงในอาหารเหลวสูตร ND ที่เติมน้ำตาลซูโครส 1.2 M เป็นเวลา 20 นาที และนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ND ดัดแปลงที่มีน้ำตาลซูโครส 1% (w/v) และน้ำต้มมันฝรั่ง 1% (w/v) เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2°C ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 40 $\mu mol\ m^{-2} s^{-1}$

บันทึกปริมาณน้ำที่เหลือภายในเมล็ดเทียมภายหลังจากการดึงน้ำออกเป็นเวลา 0-8 ชั่วโมง และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตภายหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการเก็บที่ไนโตรเจนเหลว จากนั้นจึงย้ายโพรโทคอร์มมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตต่อไป

4.3 การเก็บรักษาโพรโทคอร์มที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งโดยวิธี encapsulation-vitrification

นำโพรโทคอร์มกล้วยไม้ที่เจริญจากการเพาะเลี้ยงเมล็ด เป็นเวลา 30 วัน มาผลิตเป็นเมล็ดเทียม ซึ่งเตรียมโดยใช้อาหารเหลว ND ที่เติม sodium alginate 3% จากนั้นทำให้แข็งโดยหยดลงในอาหารเหลว ND ที่เติม $CaCl_2$ 100 mM เขย่าเป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 25±2°C นำเมล็ดเทียมที่ได้มาใส่ลงในหลอด cryotube ขนาด 2 มล. ที่มีสารละลาย LS 1.5 มล. แช่เป็นเวลานาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 25±2°C จากนั้นเทสารละลาย LS ออก แล้วเติมสารละลาย PVS2 ลงไป เพื่อดึงน้ำออกจากเมล็ด โดยแปรผันระยะเวลาในการแช่สาร (0-300 นาที) ที่อุณหภูมิ 0°C เมื่อครบระยะเวลาจึงนำหลอด cryotube เก็บลงในไนโตรเจนเหลวอย่างรวดเร็ว ภายหลังจากการเก็บในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 วัน นำหลอด cryotube มาทำละลาย โดยแช่ในน้ำที่มีอุณหภูมิประมาณ 40°C เป็นเวลา 2-3 นาที เทสารละลาย PVS2 ออก แช่เมล็ดเทียมลงในอาหารเหลวสูตร ND ที่เติมน้ำตาลซูโครส 1.2 M เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 25±2°C แล้วจึงนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ND ดัดแปลงที่มีน้ำตาลซูโครส 1% (w/v) และน้ำต้มมันฝรั่ง 1% (w/v) เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2°C ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 40 $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$

บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตภายหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการเก็บที่ไนโตรเจนเหลว จากนั้นจึงย้ายโพรโทคอร์มมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตต่อไป