

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### อุปกรณ์

1. ฝักเอื้องเงินหลวงอายุ 12 เดือน จากด่านสิงขร จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
2. เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่
  - 2.1 เครื่องชั่ง
  - 2.2 หม้อนึ่งความดัน
  - 2.3 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
  - 2.4 ตู้ปลอดเชื้อ
  - 2.5 เครื่องมือผ่าตัด ได้แก่ มีดผ่าตัด ปากคีบ ตะเกียงแอลกอฮอล์
  - 2.6 ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
3. สารเคมีและวัสดุในการเตรียมอาหาร ได้แก่
  - 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร VW (1949) และสูตร MS (1962)
  - 3.2 สารเคมีที่ใช้ฆ่าเชื้อ ได้แก่ เอทานอล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) และ โซเดียมไฮโปคลอไรด์ ( $\text{NaHCl}$ )
  - 3.3 น้ำกลั่น
  - 3.4 กล้วยหอมและมันฝรั่ง
  - 3.5 น้ำตาลทรายและผงวุ้น
  - 3.6 สารเคมีที่ใช้ในการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{NaOH}$ ) และสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ( $\text{HCl}$ )
  - 3.7 พงอานกัมมันต์

## วิธีการทดลอง

### การทดลองที่ 1 การเพาะเมล็ดเอื้องเงินหลวงและการพัฒนาโปรโตคอร์ม

#### การเพาะเมล็ดเอื้องเงินหลวง

นำเมล็ดจากฝักเอื้องเงินหลวงมาเพาะบนอาหารสูตร VW (1949) ที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 150 มิลลิตรต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร ปรับ pH 5.2 เติมน้ำ 7 กรัมต่อลิตร ผงถ่านกัมมันต์ 1.5 กรัมต่อลิตร เคาเมล็ดจากฝักเอื้องเงินหลวงแก่ที่ใกล้แตกใส่กระดาษกรองที่สะอาด ใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 6 ปริมาณ 1 ส่วน ผสมน้ำกลั่นที่นำเชื้อแล้ว 2 ส่วน ในบีกเกอร์ปริมาตร 50 มิลลิตร เขย่านาน 20 นาที ใช้ช้อนตักสารตักเมล็ดกล้วยไม้โรยลงบนอาหาร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในห้องอุณหภูมิ  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  ได้รับแสงวันละ 16 ชั่วโมง ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ (สภาพแวดล้อมนี้ใช้ในการทดลอง) เป็นเวลา 3 เดือน จนได้โปรโตคอร์ม

#### การพัฒนาโปรโตคอร์ม

นำโปรโตคอร์มที่ได้จากการเพาะเมล็ดเอื้องเงินหลวงบนอาหารสูตร VW (1949) อายุ 3 เดือน มาพัฒนาด้วยวิธีการต่างๆ คือ

**วิธีที่ 1** นำโปรโตคอร์มไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW (1949) สำหรับย้ายต้นอ่อนที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 150 มิลลิตรต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร ปรับ pH 5.2 เติมกล้วยหอม 100 กรัมต่อลิตร น้ำ 7 กรัมต่อลิตร ผงถ่านกัมมันต์ 1.5 กรัมต่อลิตร เรียกว่าสูตรอาหารแข็ง (Solid Media : SM) ใช้ช้อนตักสารตักโปรโตคอร์มโรยลงบนอาหาร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

**วิธีที่ 2** นำโปรโตคอร์มไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ 1 ซึ่งเป็น อาหารสูตร VW (1949) ที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 150 มิลลิตรต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร ปรับ pH 5.2 เรียกว่าสูตรอาหารเหลว 1 (Liquid Media : LM1) เขย่าด้วยความเร็ว 190 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 เดือน แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงต้นอ่อนสูตร VW (1949) ต่อเป็นเวลา 1 เดือน

**วิธีที่ 3** นำโปรโตคอร์มไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ 2 ซึ่งเป็นอาหารสูตร VW ที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 150 มิลลิตรต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร สารอินทรีย์จากสูตร MS

(1962) 10 มิลลิลิตรต่อลิตร ปรับ pH 5.2 เรียกว่าสูตรอาหารเหลว 2 (Liquid Media: LM2) เช้าด้วย  
ความเร็ว 190 รอบต่อนาที นาน 1 เดือน แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงด้นอ่อนสูตร VW (1949)  
ต่อเป็นเวลา 1 เดือน

## การทดลองที่ 2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อน เอื้องเงินหลวง

### 1. เตรียมอาหารดัดแปลงสูตร VW (1949) 12 สูตร

อาหารดัดแปลง แต่ละสูตรมีรายละเอียดดังนี้

สูตรที่ 1 อาหาร VW (1949) ดัดแปลง ประกอบด้วย น้ำมะพร้าวอ่อน 150 มิลลิลิตร  
ต่อลิตร ู้น 7 กรัมต่อลิตร กล้วยหอมบด 100 กรัมต่อลิตร ผงถ่านกัมมันต์ 1.5 กรัมต่อลิตร และ  
น้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร (B+10S)

สูตรที่ 2 อาหาร VW (1949) ดัดแปลง ประกอบด้วย น้ำมะพร้าวอ่อน 150 มิลลิลิตร  
ต่อลิตร ู้น 7 กรัมต่อลิตร กล้วยหอมบด 100 กรัมต่อลิตร ผงถ่านกัมมันต์ 1.5 กรัมต่อลิตร และ  
น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร (B+20S)

สูตรที่ 3 อาหาร VW (1949) ดัดแปลง ประกอบด้วย น้ำมะพร้าวอ่อน 150 มิลลิลิตร  
ต่อลิตร ู้น 7 กรัมต่อลิตร กล้วยหอมบด 100 กรัมต่อลิตร ผงถ่านกัมมันต์ 1.5 กรัมต่อลิตร และ  
น้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร และสารอินทรีย์จากสูตร MS (1962) (B+10S+MS)

สูตรที่ 4 อาหาร VW (1949) ดัดแปลง ประกอบด้วย น้ำมะพร้าวอ่อน 150 มิลลิลิตร  
ต่อลิตร ู้น 7 กรัมต่อลิตร กล้วยหอมบด 100 กรัมต่อลิตร ผงถ่านกัมมันต์ 1.5 กรัมต่อลิตร และ  
น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร และสารอินทรีย์จากสูตร MS (1962) (B+20S+MS)

สูตรที่ 5 อาหาร VW (1949) ดัดแปลง ประกอบด้วย น้ำมะพร้าวอ่อน 150 มิลลิลิตร  
ต่อลิตร ู้น 7 กรัมต่อลิตร มันฝรั่งบด 100 กรัมต่อลิตร ผงถ่านกัมมันต์ 1.5 กรัมต่อลิตร และน้ำตาล  
ซูโครส 10 กรัมต่อลิตร (P+10S)

สูตรที่ 6 อาหาร VW (1949) คัดแปลง ประกอบด้วย น้ําพะร้าวอ่อน 150 มิลลิลิตร ต่อลิตร วุ้น 7 กรัมต่อลิตร มันฝรั่งบด 100 กรัมต่อลิตร ผงถ่านกัมมันต์ 1.5 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร (P+20S)

สูตรที่ 7 อาหาร VW (1949) คัดแปลง ประกอบด้วย น้ําพะร้าวอ่อน 150 มิลลิลิตร ต่อลิตร วุ้น 7 กรัมต่อลิตร มันฝรั่งบด 100 กรัมต่อลิตร ผงถ่านกัมมันต์ 1.5 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร และสารอินทรีย์จากสูตร MS (1962) (P+10S+MS)

สูตรที่ 8 อาหาร VW (1949) คัดแปลง ประกอบด้วย น้ําพะร้าวอ่อน 150 มิลลิลิตร ต่อลิตร วุ้น 7 กรัมต่อลิตร มันฝรั่งบด 100 กรัมต่อลิตร ผงถ่านกัมมันต์ 1.5 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร และสารอินทรีย์จากสูตร MS (1962) (P+20S+MS)

สูตรที่ 9 อาหาร VW (1949) คัดแปลง ประกอบด้วย น้ําพะร้าวอ่อน 150 มิลลิลิตร ต่อลิตร วุ้น 7 กรัมต่อลิตร กลัวยหอมบด 50 กรัมต่อลิตร มันฝรั่งบด 50 กรัมต่อลิตร ผงถ่านกัมมันต์ 1.5 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร (B+P+10S)

สูตรที่ 10 อาหาร VW (1949) คัดแปลง ประกอบด้วย น้ําพะร้าวอ่อน 150 มิลลิลิตรต่อลิตร วุ้น 7 กรัมต่อลิตร กลัวยหอมบด 50 กรัมต่อลิตร มันฝรั่งบด 50 กรัมต่อลิตร ผงถ่านกัมมันต์ 1.5 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร (B+P+20S)

สูตรที่ 11 อาหาร VW (1949) คัดแปลง ประกอบด้วย น้ําพะร้าวอ่อน 150 มิลลิลิตรต่อลิตร วุ้น 7 กรัมต่อลิตร กลัวยหอมบด 50 กรัมต่อลิตร มันฝรั่งบด 50 กรัมต่อลิตร ผงถ่านกัมมันต์ 1.5 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร และสารอินทรีย์จากสูตร MS (1962) (B+P+10S+MS)

สูตรที่ 12 อาหาร VW (1949) คัดแปลง ประกอบด้วย น้ําพะร้าวอ่อน 150 มิลลิลิตรต่อลิตร วุ้น 7 กรัมต่อลิตร กลัวยหอมบด 50 กรัมต่อลิตร มันฝรั่งบด 50 กรัมต่อลิตร ผงถ่านกัมมันต์ 1.5 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร และสารอินทรีย์จากสูตร MS (1962) (B+P+20S+MS)

ตารางที่ 3.1 อาหารดัดแปลงสูตร VW (1949) 12 สูตร ที่ใช้ศึกษาการเจริญเติบโตของต้นอ่อน  
เอื้องเงินหลวงจากการพัฒนาด้วยอาหารสูตร SM LM1 และ LM2

| สูตรที่ต้นอ่อนเอื้องเงินหลวงจากการพัฒนา |                    |                    |
|-----------------------------------------|--------------------|--------------------|
| อาหารแข็งสูตร SM                        | อาหารเหลวสูตร LM1  | อาหารเหลวสูตร LM2  |
| 1(SM+B+10S)                             | 13(LM1+B+10S)      | 25(LM2+B+10S)      |
| 2(SM+B+20S)                             | 14(LM1+B+20S)      | 26(LM2+B+20S)      |
| 3(SM+B+10S+MS)                          | 15(LM1+B+10S+MS)   | 27(LM2+B+10S+MS)   |
| 4(SM+B+20S+MS)                          | 16(LM1+B+20S+MS)   | 28(LM2+B+20S+MS)   |
| 5(SM+P+10S)                             | 17(LM1+P+10S)      | 29(LM2+P+10S)      |
| 6(SM+P+20S)                             | 18(LM1+P+20S)      | 30(LM2+P+20S)      |
| 7(SM+P+10S+MS)                          | 19(LM1+P+10S+MS)   | 31(LM2+P+10S+MS)   |
| 8(SM+P+20S+MS)                          | 20(LM1+P+20S+MS)   | 32(LM2+P+20S+MS)   |
| 9(SM+B+P+10S)                           | 21(LM1+B+P+10S)    | 33(LM2+B+P+10S)    |
| 10(SM+B+P+20S)                          | 22(LM1+B+P+20S)    | 34(LM2+B+P+20S)    |
| 11(SM+B+P+10S+MS)                       | 23(LM1+B+P+10S+MS) | 35(LM2+B+P+10S+MS) |
| 12(SM+B+P+20S+MS)                       | 24(LM1+B+P+20S+MS) | 36(LM2+B+P+20S+MS) |

## 2. นำต้นกล้าที่ได้จากการพัฒนาโปรโตคอร์ม 3 วิธี ไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร 12 สูตร

คัดเลือกต้นกล้าที่ได้จากการพัฒนาโปรโตคอร์ม 3 วิธี คือจากอาหารสูตร SM LM1 และ LM2 ที่มีใบ 2-3 ใบ และมีรากอย่างน้อย 1 ราก เพาะเลี้ยงบนอาหารเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของต้นอ่อน สูตรละ 10 ขวด ขวดละ 1 ต้น รวมเป็น 36 การทดลอง นาน 6 เดือน หลังเพาะเลี้ยงครบ 6 เดือน นำต้นกล้ามาล้างวุ้นอาหารออกให้หมด แล้วบันทึก จำนวนใบ ความยาวใบ ความกว้างใบ จำนวนราก และความยาวราก วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance : ANOVA) ของค่าที่วัดได้ ในกรณีที่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จะเปรียบเทียบความแตกต่างตามวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)