บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

ในการทดลองครั้งนี้ใช้ฝัก โปรโตคอร์ม และต้นอ่อนของเอื้องแซะหลวง รวมทั้งอุปกรณ์สำหรับปฏิบัติงานในตู้กรองอากาศบริสุทธิ์ อุปกรณ์สำหรับเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมอาหารตามสูตร VW และสารเคมีที่ใช้เพิ่มเติมในแต่ละการทดลอง ดังต่อไปนี้

อุปกรณ์และสารเคมี

1. ฝักเอื้องแซะหลวง

2. โปรโตคอร์มเอื้องแซะหลวงระยะ pro meristematic และระยะ leaf primordia ที่ได้จากการเพาะเมล็ดบนอาหารสังเคราะห์ 14 และ 21 วัน

3. ต้นอ่อนเอื้องแซะหลวงที่ได้จากการเพาะเมล็ดบนอาหารสังเคราะห์ อายุ 3 เดือน

4. อุปกรณ์สำหรับปฏิบัติงานในตู้กรองอากาศบริสุทธิ์(air flow cabinet) ปากคีบ (forceps) มีดผ่าตัด ตะเกียงแอลกอฮอล์ จานแก้ว (petri dish) เป็นต้น

5. อุปกรณ์สำหรับเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง เช่น เครื่องชั่งชนิดทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง เครื่องวัด ความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) เครื่องคนสารแบบมีแม่เหล็ก (megnetic stirrer) บีกเกอร์ แท่งแก้วคนสาร และขวดทรงกลมสำหรับใส่อาหาร

6. สารเคมีสำหรับฆ่าเชื้อ เอทธานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์

7. สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมอาหารธาตุอาหารตามสูตร VW (ตารางผนวก 1) โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล น้ำตาลซูโครส (sucrose) น้ำกล้วย น้ำมะพร้าว ผงถ่าน และผงวุ้น

8. สารเคมีที่เพิ่มเติมในอาหารสังเคราะห์สำหรับการชะลอการเจริญเติบโต น้ำตาลซูโครส (sucrose) แมนนิทอล (mannitol) และสารชะลอการเจริญเติบโตแพคโคลบิวทราโซล (paclobutrazol)

9. สารเคมีที่ทำให้เกิดเจลของเมล็ดเทียม (ตารางผนวก 2 ภาพผนวก 1) โซเดียมอัลจิเนต (sodium alginate) และแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$)

10. สารเคมีที่ใช้ในการเก็บแช่แข็ง (ตารางผนวก 3 ภาพผนวก 4) ซูโครส (sucrose) ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) กลีเซอรอล (glycerol) เอทธิลีนไกลคอล (ethylene glycol) และไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ (dimethysulphoxide)

วิธีการวิจัย

การศึกษาการเก็บรักษาพันธุกรรมเอื้องแซะหลวงในสภาพปลอดเชื้อแบ่งการศึกษาออกเป็น 3 การทดลองดังต่อไปนี้คือ

การทดลองที่ 1
ศึกษาการชะลอการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวง

การทดลองนี้ศึกษาถึงระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำตาลซูโครส น้ำตาลแมนนิทอล และสารชะลอการเจริญเติบโตแพคโคลบิวทราโซล สำหรับการชะลอการเจริญเติบโตเพื่อยืดเวลาการย้ายเลี้ยงครั้งต่อไปให้นานมากขึ้น

การทดลองย่อยที่ 1.1 ผลของระดับความเข้มข้นของซูโครสต่อการชะลอการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวง

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) มีระดับความเข้มข้นของซูโครสที่ต่างกัน 6 ระดับเป็นสิ่งทดลอง (Treatments) คือ 0 2 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งสิ้น 6 สิ่งทดลองๆ 10 ซ้ำๆละ 2 ต้น รายละเอียดของสิ่งทดลอง มีดังนี้

สิ่งทดลองที่ 1 ไม่เติมซูโครส
สิ่งทดลองที่ 2 ซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์
สิ่งทดลองที่ 3 ซูโครส 4 เปอร์เซ็นต์
สิ่งทดลองที่ 4 ซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์
สิ่งทดลองที่ 5 ซูโครส 8 เปอร์เซ็นต์
สิ่งทดลองที่ 6 ซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์

วิธีการทดลอง

คัดเลือกต้นอ่อนของเอื้องแซะที่มีอายุ 3 เดือนโดยเลือกให้มีขนาดใกล้เคียงกัน จากนั้นย้ายต้นอ่อนเอื้องแซะลงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร VW (1949) ที่มีความแตกต่างของระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 6 ระดับคือ 0 2 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการทดลอง 10 ซ้ำๆละ 2 ต้น ภายหลังจากย้ายต้นอ่อนทำการเก็บข้อมูลก่อนทำการทดลอง และทำการเก็บข้อมูลทุกๆ 1 เดือนเป็นระยะเวลา 6 เดือน

การบันทึกข้อมูล โดยเก็บข้อมูลดังต่อไปนี้ คือ

1. ความสูงของลำลูกกล้วย : วัดจากโคนลำ (บนผิวอาหารสังเคราะห์) จนถึงส่วนปลายลำ
2. ความกว้างของลำลูกกล้วย : วัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณส่วนที่กว้างที่สุดของลำ

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (Statistical Analysis System) โดยใช้ Model CRD และแสดงผลในรูปของตาราง ANOVA โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละค่าสังเกต โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ระยะเวลาทำการทดลอง

เริ่มทำการทดลองเดือนกุมภาพันธ์ 2548 และเสร็จสิ้นการทดลองเมื่อเดือนสิงหาคม 2548

ภาพ 1 ลักษณะของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวงที่นำมาทดลอง

การทดลองย่อยที่ 1.2 ผลของระดับความเข้มข้นของแมนนิทอลต่อการชะลอการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวง

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) มีระดับความเข้มข้นของแมนนิทอลที่ต่างกัน 6 ระดับเป็นสิ่งทดลอง (Treatments) คือ 0 2 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งสิ้น 6 สิ่งทดลองๆ 10 ซ้ำๆละ 2 ต้น รายละเอียดของสิ่งทดลอง มีดังนี้

สิ่งทดลองที่ 1 ไม่เติมแมนนิทอล

สิ่งทดลองที่ 2 แมนนิทอล 2 เปอร์เซ็นต์

สิ่งทดลองที่ 3 แมนนิทอล 4 เปอร์เซ็นต์

สิ่งทดลองที่ 4 แมนนิทอล 6 เปอร์เซ็นต์

สิ่งทดลองที่ 5 แมนนิทอล 8 เปอร์เซ็นต์

สิ่งทดลองที่ 6 แมนนิทอล 10 เปอร์เซ็นต์

วิธีการทดลอง

วิธีการการเตรียมต้น วิธีการทดลอง การบันทึกข้อมูล การวิเคราะห์ข้อมูล ระยะเวลาทำการทดลอง ทำเช่นเดียวกันกับการทดลองย่อยที่ 1.1 แต่ย้ายต้นอ่อนเอื้องแซะลงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร VW (1949) ที่มีระดับความเข้มข้นของแมนนิทอลแตกต่างกัน 6 ระดับคือ 0 2 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์

การทดลองย่อยที่ 1.3 ผลของระดับความเข้มข้นของแพคโคลบิวทราโซลต่อการชะลอการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวง

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) มีระดับความเข้มข้นของแพคโคลบิวทราโซลที่ต่างกัน 6 ระดับเป็นสิ่งทดลอง (Treatments) คือ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1 ppm รวมทั้งสิ้น 6 สิ่งทดลองๆ 10 ซ้ำๆละ 2 ต้น รายละเอียดของสิ่งทดลอง มีดังนี้

สิ่งทดลองที่ 1 ไม่เติมแพคโคลบิวทราโซล

สิ่งทดลองที่ 2 แพคโคลบิวทราโซล 0.2 ppm

สิ่งทดลองที่ 3 แพคโคลบิวทราโซล 0.4 ppm

สิ่งทดลองที่ 4 แพคโคลบิวทราโซล 0.6 ppm

สิ่งทดลองที่ 5 แพคโคลบิวทราโซล 0.8 ppm

สิ่งทดลองที่ 6 แพคโคลบิวทราโซล 1 ppm

วิธีการทดลอง

วิธีการการเตรียมต้น วิธีการทดลอง การบันทึกข้อมูล การวิเคราะห์ข้อมูล ระยะเวลาทำการทดลอง ทำเช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 1.1 แต่ย้ายต้นอ่อนเอื้องแซะลงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร VW (1949) ที่มีระดับความเข้มข้นของแพคโคลบิวทราโซลแตกต่างกัน 6 ระดับคือ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1 ppm

การทดลองที่ 2
ศึกษาวิธีการและอุณหภูมิในการเก็บรักษาเมล็ดและโปรโตคอร์ม ของเอื้องแซะหลวง

ศึกษาถึงการเก็บรักษาชิ้นส่วนของเมล็ดและโปรโตคอร์มที่มีระยะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน 2 ระยะคือ ระยะ pro meristematic และระยะ leaf primordia โดยเก็บรักษาเมล็ดเทียมที่มีความแตกต่างของอุณหภูมิ 2 ระดับคือ 4 และ 25 องศาเซลเซียส เพื่อทราบถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาชิ้นส่วนต่างๆทั้งเมล็ดและโปรโตคอร์มของเอื้องแซะ

การทดลองย่อยที่ 2.1 ผลของอุณหภูมิและการเคลือบต่อการเก็บรักษาเมล็ดเอื้องแซะหลวง

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ 2 x 2 Factorial in Completely Randomized Design โดยแบ่งเป็น 2 ปัจจัยคือ การเคลือบ 2 แบบ (ไม่เคลือบเมล็ด และเคลือบเมล็ด) และอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษา 2 ระดับ (4 และ 25 องศาเซลเซียส) รวมทั้งสิ้น 4 สิ่งทดลองๆละ 4 ซ้ำๆละ 10 เมล็ดเทียม รายละเอียดของสิ่งทดลอง มีดังนี้

สิ่งทดลองที่ 1 ไม่เคลือบเมล็ด เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สิ่งทดลองที่ 2 ไม่เคลือบเมล็ด เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

สิ่งทดลองที่ 3 เคลือบเมล็ด เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สิ่งทดลองที่ 4 เคลือบเมล็ด เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

วิธีการทดลอง

ทำการแบ่งเมล็ดเอื้องแซะออกเป็น 2 ส่วน โดยนำไปเคลือบด้วยสารอัลจิเนตหนึ่งส่วน จากนั้นนำทั้งเมล็ดเอื้องแซะที่ไม่ได้เคลือบและที่เคลือบบรรจุในหลอดทดลอง หุ้มทับด้วยพาราฟิล์มและทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส นำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร VW (1949) ดัดแปลงเพื่อทดสอบความงอกทุกๆ 1 เดือนเป็นระยะเวลา 6 เดือน โดยเก็บข้อมูลจำนวนวันที่เมล็ดเริ่มงอก และเปอร์เซ็นต์ความงอก

การบันทึกข้อมูล

1. จำนวนวันที่เมล็ดเริ่มงอก : นับจำนวนวันตั้งแต่วันที่เริ่มเพาะเมล็ดเทียมลงบนอาหารสังเคราะห์จนถึงวันที่เมล็ดงอกเป็นโปรโตคอร์ม

2. เปอร์เซ็นต์ความงอก: เปรียบเทียบปริมาณของเมล็ดที่งอกกับเมล็ดที่เพาะทั้งหมด และคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (Statistical Analysis System) โดยใช้ Model Factorial in CRD และแสดงผลในรูปของตาราง ANOVA โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละค่าสังเกตโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ระยะเวลาทำการทดลอง

เริ่มทำการทดลองเดือนกุมภาพันธ์ 2548 และเสร็จสิ้นการทดลองเมื่อเดือนสิงหาคม 2548

การทดลองย่อยที่ 2.2 ผลของอุณหภูมิและระยะการเจริญเติบโตต่อการเก็บรักษาโปรโตคอร์ม

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ 2 x 2 Factorial in Completely Randomized Design โดยแบ่งเป็น 2 ปัจจัยคือ เมล็ดเทียมของโปรโตคอร์มที่มีระยะการเจริญเติบโตต่างกัน 2 ระยะ (ระยะ pro meristematic และระยะ leaf primordia) และอุณหภูมิ 2 ระดับ (4 และ 25 องศาเซลเซียส) รวมทั้งสิ้น 4 สิ่งทดลองๆละ 4 ซ้ำๆละ 10 เมล็ดเทียม รายละเอียดของสิ่งทดลอง มีดังนี้

สิ่งทดลองที่ 1 โปรโตคอร์มระยะ pro meristematic ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
สิ่งทดลองที่ 2 โปรโตคอร์มระยะ pro meristematic ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
สิ่งทดลองที่ 3 โปรโตคอร์มระยะ leaf primordia ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
สิ่งทดลองที่ 4 โปรโตคอร์มระยะ leaf primordia ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

วิธีการทดลอง

เคลือบโปรโตคอร์มทั้ง 2 ระยะด้วยสารอัลจิเนต โดยนำโปรโตคอร์มมาแขวนลอยในสารละลายโซเดียมอัลจิเนต และดูดโปรโตคอร์มหยดลงในแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรตทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 30 นาที ทำการเขย่าเป็นระยะหลังจากนั้นล้างเมล็ดเทียมด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ซับเมล็ดเทียมให้แห้งและบรรจุในหลอดทดลองหุ้มทับด้วยพาราฟิล์ม (ภาพผนวก 2) ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการทดสอบการเจริญเติบโตทุกๆ 1 เดือน เป็นระยะเวลา 6 เดือน โดยนำเมล็ดเทียมที่เก็บรักษามาเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร VW (1949) ดัดแปลง (ภาพผนวก 3) ทำการเก็บข้อมูลหลังจากนำมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ดังต่อไปนี้ คือ จำนวนวันที่เมล็ดเทียมงอก และเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเทียม การวิเคราะห์ผลการทดลองเหมือนกับการทดลองย่อย 2.1

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ผลการทดลองเหมือนกับการทดลองย่อย 2.1

การบันทึกข้อมูล

1. จำนวนวันที่เมล็ดเทียมงอก : นับจำนวนวันตั้งแต่วันที่เริ่มเพาะเมล็ดเทียมลงบนอาหารสังเคราะห์จนถึงวันที่โปรโตคอร์มงอกออกมาจากเมล็ดเทียม

2. เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเทียม : นับจำนวนเมล็ดเทียมที่งอกและคิดเป็นเปอร์เซ็นต์

ระยะเวลาทำการทดลอง

เริ่มทำการทดลองเดือนธันวาคม 2547 และเสร็จสิ้นการทดลองเมื่อเดือนสิงหาคม 2548

การทดลองที่ 3
ศึกษาการเก็บรักษาเมล็ดและโปรโตคอร์ม ของเอื้องแซะหลวงในไนโตรเจนเหลว

การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมเอื้องแซะหลวงในไนโตรเจนเหลว ศึกษาถึงวิธีการลดปริมาณน้ำในเซลล์ของเมล็ดและโปรโตคอร์มก่อนนำไปเก็บรักษาแบบแช่แข็งที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสของไนโตรเจนเหลว เพื่อให้ภายหลังการเก็บแช่แข็งเมล็ดและโปรโตคอร์มสามารถกลับมาเจริญเติบโตได้ตามปกติ

การทดลองย่อยที่ 3.1 ศึกษาการเก็บรักษาเมล็ดด้วยการเติมสารปกป้องเนื้อเยื่อพืชในการเตรียมเมล็ดเอื้องแซะหลวงก่อนการเก็บแช่แข็ง

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) โดยมีระยะเวลาในการเติมสารปกป้องเนื้อเยื่อพืช PVS2 9 ระยะเวลา คือ 0 10 20 30 40 50 60 70 และ 80 นาที เป็นสิ่งทดลองรวมเป็น 9 สิ่งทดลอง 4 ซ้ำ รายละเอียดของสิ่งทดลอง มีดังนี้

สิ่งทดลองที่ 1 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 0 นาที
สิ่งทดลองที่ 2 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 10 นาที
สิ่งทดลองที่ 3 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 20 นาที
สิ่งทดลองที่ 4 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 30 นาที
สิ่งทดลองที่ 5 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 40 นาที
สิ่งทดลองที่ 6 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 50 นาที
สิ่งทดลองที่ 7 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 60 นาที
สิ่งทดลองที่ 8 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 70 นาที
สิ่งทดลองที่ 9 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 80 นาที

วิธีการทดลอง

นำเมล็ดเอื้องแซะใส่ลงในหลอดทดลองสำหรับการแช่แข็ง จากนั้นเติมสารละลายสูตร PVS2 เป็นระยะเวลา 9 ระยะเวลาคือ 0 10 20 30 40 50 60 70 และ80 นาที เมื่อครบตามระยะเวลาที่กำหนดนำลงในไนโตรเจนเหลว (-196°C) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพผนวก 5) เมื่อครบ 24 ชั่วโมงนำมาละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2

นาที ดูดสารละลายสูตร PVS2 ออกและทำการเติมสารละลาย RS (1.2M sucrose) ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 20 นาที จึงดูดสารละลาย RS ออก และนำโปรโตคอร์มเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร VW (1949) ดัดแปลง (ภาพผนวก 6) ทำการสังเกตและเก็บข้อมูลจำนวนวันที่เมล็ดพัฒนาเป็นโปรโตคอร์ม

การบันทึกข้อมูล

จำนวนวันที่เมล็ดพัฒนาเป็นโปรโตคอร์ม : นับจำนวนวันตั้งแต่วันที่เลี้ยงลงบนอาหารสังเคราะห์

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (Statistical Analysis System) โดยใช้ Model CRD และแสดงผลในรูปของตาราง ANOVA โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละค่าสังเกตโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ระยะเวลาทำการทดลอง

เริ่มทำการทดลองเดือนมีนาคม 2548 และเสร็จสิ้นการทดลองเมื่อเดือนสิงหาคม 2548

การทดลองย่อยที่ 3.2 ศึกษาวิธีการและระยะเวลาในการเติมสารปกป้องเนื้อเยื่อพืชในการเตรียมโปรโตคอร์มเอื้องแซะหลวงก่อนการเก็บแช่แข็ง

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ 2 x 9 Factorial in Completely Randomized Design โดยแบ่งเป็น 2 ปัจจัยคือ วิธีการ 2 วิธีการ (Vitrification และ Encapsulation/Vitrification) และระยะเวลาในการเติมสารปกป้องเนื้อเยื่อพืช PVS2 9 ระยะ (0 10 20 30 40 50 60 70 และ 80 นาที) รวมทั้งสิ้น 18 สิ่งทดลองๆละ 4 ซ้ำ รายละเอียดของสิ่งทดลอง มีดังนี้

สิ่งทดลองที่ 1 วิธี Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 0 นาที
สิ่งทดลองที่ 2 วิธี Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 10 นาที
สิ่งทดลองที่ 3 วิธี Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 20 นาที
สิ่งทดลองที่ 4 วิธี Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 30 นาที
สิ่งทดลองที่ 5 วิธี Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 40 นาที

สิ่งทดลองที่ 6 วิธี Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 50 นาที

สิ่งทดลองที่ 7 วิธี Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 60 นาที

สิ่งทดลองที่ 8 วิธี Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 70 นาที

สิ่งทดลองที่ 9 วิธี Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 80 นาที

สิ่งทดลองที่ 10 วิธี Encapsulation/Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 0 นาที

สิ่งทดลองที่ 11 วิธี Encapsulation/Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 10 นาที

สิ่งทดลองที่ 12 วิธี Encapsulation/Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 20 นาที

สิ่งทดลองที่ 13 วิธี Encapsulation/Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 30 นาที

สิ่งทดลองที่ 14 วิธี Encapsulation/Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 40 นาที

สิ่งทดลองที่ 15 วิธี Encapsulation/Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 50 นาที

สิ่งทดลองที่ 16 วิธี Encapsulation/Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 60 นาที

สิ่งทดลองที่ 17 วิธี Encapsulation/Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 70 นาที

สิ่งทดลองที่ 18 วิธี Encapsulation/Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 80 นาที

วิธีการทดลอง

นำโปรโตคอร์มที่ไม่ได้เคลือบและที่เคลือบด้วยสารอัลจิเนตใส่ลงในหลอดทดลองสำหรับการแช่แข็ง จากนั้นเติมสารละลายสูตร PVS2 เป็นระยะเวลา 9 ระยะเวลาคือ 0 10 20 30 40 50 60 70 และ 80 นาที เมื่อครบตามระยะเวลาที่กำหนดนำลงในไนโตรเจนเหลว (-196°C) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลา 24 ชั่วโมงนำหลอดทดลองออกจากไนโตรเจนเหลว นำมาละลายในกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ดูดสารละลายสูตร PVS2 ออกและทำการเติมสารละลาย RS (1.2M sucrose) ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 20 นาที จึงดูดสารละลาย RS ออก และนำโปรโตคอร์มเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร VW (1949) ดัดแปลง ทำการสังเกตและเก็บข้อมูลจำนวนวันที่โปรโตคอร์มพัฒนา และเปอร์เซ็นต์ความงอก

การบันทึกข้อมูล

1. จำนวนวันที่โปรโตคอร์มพัฒนา : นับจำนวนวันตั้งแต่วันที่เลี้ยงลงบนอาหารสังเคราะห์
2. เปอร์เซ็นต์ความงอก : นับจำนวนโปรโตคอร์มมีการพัฒนาและคิดเป็นเปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (Statistical Analysis System) โดยใช้ Model Factorial in CRD และแสดงผลในรูปของตาราง ANOVA โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละค่าสังเกตโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ระยะเวลาทำการทดลอง

เริ่มทำการทดลองเดือนพฤศจิกายน 2547 และสิ้นสุดการทดลองเมื่อเดือนกุมภาพันธ์ 2548

สถานที่ทำการทดลอง

ทุกการทดลองทำการศึกษา ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อาคารเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระศรีนครินทร์ ภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่