

อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

1. วัสดุและอุปกรณ์

- 1.1 กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีนจากต้นซึ่งเก็บรวบรวมจากป่า และนำมาปลูกเลี้ยงภายใต้สภาพหลังคากันฝน และลดความชื้นของแสงให้มีความชื้นแสงประมาณ 1,500 ลักซ์ ที่เรือนเพาะชำ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- 1.2 ไมโครปิเปต
- 1.3 ตู้กรองอากาศ (Air flow cabinet)
- 1.4 ชั้นสำหรับวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- 1.5 เครื่องเขย่า
- 1.6 เครื่องชั่งชนิดละเอียด (Analytical balance)
- 1.7 เครื่องชั่งไฟฟ้า (Electrical balance)
- 1.8 กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ส่องกลับ (Inverted microscope)
- 1.9 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
- 1.10 เครื่องฝานเนื้อเยื่อแช่แข็ง (Freezing microtome)
- 1.11 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ
- 1.12 เต้าไฟฟ้า
- 1.13 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 50 มล
- 1.14 ขวดปากกว้างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7.5 ซม สูง 12.5 ซม
- 1.15 ปิเปต
- 1.16 บีกเกอร์
- 1.17 กระบอแก้ววัดปริมาตร
- 1.18 กรวยแก้ว

- 1.19 จานเพาะเชื้อ
- 1.20 ข้อนตักสาร
- 1.21 ขวดใส่สารละลายเข้มข้น
- 1.22 กระจกหอลูมิเนียมฟอยล์
- 1.23 วัสดุที่ใช้ในตู้กรองอากาศ ได้แก่
  - 1.23.1 ด้ามมีดผ่าตัด เบอร์ 3
  - 1.23.2 ใบมีดผ่าตัด เบอร์ 11
  - 1.23.3 ปากคีบ (Forceps)
  - 1.23.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์
  - 1.23.5 แผ่นพลาสติกขนาด 70 x 90 มม
  - 1.23.6 กระจกกรอง Whatman เบอร์ 3
  - 1.23.7 หลอดทดลองใส่แอลกอฮอล์
- 1.24 วัสดุอื่น ๆ เช่น ข่างรัด แผ่นป้ายเขียนกรรมวิธีและวันที่ทดลอง

## 2. สารเคมี

- 2.1 สารที่ใช้ทำความสะอาด และฆ่าเชื้อ
  - 2.1.1 เอทิลแอลกอฮอล์ เข้มข้น 70 %
- 2.2 สารที่ใช้สำหรับเตรียมอาหาร
  - 2.2.1 เกลือให้ธาตุอาหารหลักต่าง ๆ ตามสูตรดัดแปลง Vacin and Went (1949) , Murashige and Skoog (1962) , Thomale GD (1954) และ Schenk and Hildebrandt (1972) (ตารางที่ 1 หน้า 17 )
  - 2.2.2 เกลือให้ธาตุอาหารรองต่าง ๆ ตามสูตร MS (1962) (ตารางที่ 2 หน้า 18 )
  - 2.2.3 สารอินทรีย์ต่าง ๆ ตามสูตร I (ตารางที่ 3 หน้า 19 )



2.2.4 Ferrous sulphate ของบริษัท J.T.Baker Chemical Co.,  
Philipsburg N.J., USA.

2.2.5 Disodium ethylene diaminetetraacetate ของบริษัท  
Koch-Light Laboratories Ltd., England

2.2.6 สารควบคุมการเจริญของพืช

2.2.6.1 Naphthalene acetic acid (NAA) ของบริษัท Sigma  
Chemical Co., USA.

2.2.6.2 Indolebutyric acid (IBA)

2.2.6.3 6-Benzyl amino purine (BAP) ของบริษัท Sigma  
Chemical Co., USA.

2.2.7 สารช่วยการเจริญของพืช

2.2.7.1 Peptone ของบริษัท B.D.H.Chemicals Ltd.London

2.2.7.2 D-biotin ของบริษัท B.D.H.Chemicals Ltd.London

2.2.8 Potassium hydroxide 1 N

2.2.9 Hydrochloric acid 1 N

2.2.10 น้ำกลั่นชนิดกลั่นจากเครื่องแก้ว

2.2.11 กล้วยหอมสั๊ก

2.2.12 ถ่านผง

2.2.13 น้ำมะพร้าว

2.2.14 ผงวุ้น ตราเฮลิคอปเตอร์

### 3. การเตรียมส่วนที่ใช้ทดลองของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน

#### 3.1 การผสมเกสร

การผสมเกสรกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน ทำโดย เลือกดอกที่สมบูรณ์  
ดอกที่ 1 และ 2 ของช่อดอก (ภาพที่ 2 หน้า 14 ) ซึ่งกลีบดอกบานเต็มที่ และเกสรตัวผู้อยู่ใน



ภาพที่ 2 ดอกกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน ตำแหน่งดอกที่ 1 และ 2

ของช่อดอก ที่ใช้ในการผสมเกสร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved



ระยะที่สามที่เหลือ มีลักษณะเห็นชวคล้ายขี้ผึ้ง เด็ดส่วนที่เป็นกระเป๋าดอก (pouch) ออก ใช้ปลายไม้จุ่มพ่นที่สะอาดแตะก้นเกสรตัวผู้ครึ่งละก้อน แล้วนำไปติดที่แฉ่งเกสรตัวเมีย กดเบา ๆ เพื่อให้ติดได้สนิท ผูกป้ายระบุ วัน เดือน ปี ที่ทำการผสมเกสรไว้ที่ก้านดอกแต่ละดอก

### 3.2 การดูแลต้นกล้วยไม้หลังการผสมเกสร

รดน้ำเป็นประจำทุกเช้า วันละครั้ง และใส่ปุ๋ยเคมีทวินเฟอर्टัสตร 10-52-17 โดยฉีดพ่นให้ทางใบเป็นประจำ สัปดาห์ละครั้ง ฉีดพ่นยาป้องกันเชื้อรา และกำจัดแมลงบ้างเป็นครั้งคราว

### 3.3 การเพาะเมล็ดกล้วยไม้

นำฝักกล้วยไม้ที่อายุครบตามที่กำหนดในแต่ละการทดลอง มาทำความสะอาดเบื้องต้น โดยการพอกล้างที่ผิวฝักด้วยน้ำยาไลโปนเอฟและล้างน้ำให้สะอาด ตัดแต่งปลายฝักส่วนที่เป็นสีน้ำตาลออก แล้วทำความสะอาดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70 % นานประมาณ 5 นาที นำเข้าตู้กรองอากาศ ใช้ปากคีบคีบฝักแล้วนำไปประมาณ 3 วินาที นำไปวางบนจานเพาะเชื้อที่หมั่นแผ่นพลาสติกที่ฆ่าเชื้อแล้วรองอยู่ ใช้มีดกรีดผ่าฝักออกตามแนวยาว โดยกรีดระหว่างรอยตะเข็บของฝัก จากนั้นใช้มีดเขี่ยเมล็ดจากแต่ละฝักลงในขวดเพาะแต่ละขวดซึ่งมีอาหารเหลวบรรจุอยู่ ปิดปากขวดด้วยแผ่นพลาสติกที่ฆ่าเชื้อแล้ว และใช้ยางรัด หลังจากทำการเพาะเมล็ดเรียบร้อยแล้ว ใช้แผ่นกระดาษปิดปากขวดทับบนแผ่นพลาสติกอีกชั้นหนึ่งเพื่อป้องกันกระดาษอลูมิเนียมฟอยล์แทงแผ่นพลาสติก จากนั้นใช้กระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ห่อแต่ละขวดให้มิดชิดเพื่อป้องกันไม่ให้แสงสว่างเข้านำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ให้ความเร็วรอบประมาณ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิประมาณ 28 - 30 องศาเซลเซียส

### 3.4 การเตรียมโปรโตคอร์ม

นำโปรโตคอร์มที่ได้จากการเพาะเมล็ดจากฝักอายุ 28 สัปดาห์ ในอาหารเหลวสูตรตัดแปลงที่มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับสูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองที่ 1 โดยเพาะ 1 ฝักต่อขวด เลือกขวดที่เมล็ดมีความงอกมากกว่าร้อยละ 75 (คำนวณโปรโตคอร์มที่ใช้ทั้งหมด โดยแบ่งโปรโตคอร์มในแต่ละขวดออกเป็น 5 ส่วน แต่ละส่วนใช้สำหรับการศึกษาในแต่ละซ้ำ) นำโปรโตคอร์มที่ต้องใช้ในการทดลองทั้งหมดมารวมกัน จากนั้นบีบเพื่อสับแบ่งโปรโตคอร์มออก



เป็นกลุ่ม ๆ ตามจำนวนกรรมวิธีที่ใช้ทดลอง ทำการล้าง โปรโตคอร์ม โดยการดูดอาหารที่ใช้เพาะ ออกด้วยปิเปต จากนั้น ใช้อาหารเหลวที่มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับอาหารวันตามกรรมวิธีต่าง ๆ ที่ใช้ทดลองล้าง โปรโตคอร์ม ยกเว้นในการทดลองที่ 6 ซึ่งใช้อาหารเหลวที่มีส่วนประกอบตาม กรรมวิธีที่ 1 สำหรับล้าง โปรโตคอร์ม ทำการล้าง โปรโตคอร์ม 2 ครั้ง หลังจากนั้นทำการดูด โปรโตคอร์มพร้อมอาหารเหลวที่เตรียมไว้สำหรับแต่ละกรรมวิธีที่ใช้ทดลอง ปริมาตร 2 มล ลง เลียงบนอาหารวันตามกรรมวิธีนั้น ๆ เอียงขวดไปมาเพื่อให้ โปรโตคอร์มกระจายทั่วผิวหน้าวัน ปิดปากขวดด้วยแผ่นพลาสติกใส ใช้ยางรัด และปิดปากขวดด้วยฝาโลหะอีกชั้น นำไปเลี้ยงบนชั้น เลียงเนื้อเยื่อโดยจัดให้ได้รับแสงที่มีความเข้มประมาณ 300 ลักซ์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นเพิ่มแสงโดยให้ได้รับแสงที่มีความเข้มประมาณ 1,000 ลักซ์ ตลอด 24 ชั่วโมง ที่ อุณหภูมิประมาณ 26 - 28 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง

#### 4. การเตรียมสารละลายเข้มข้น (Stock solution)

##### 4.1 การเตรียมธาตุอาหารหลัก

เตรียมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักที่ใช้ในสูตร Vacin and Went (1949) ดัดแปลง Thomale GD(1954) Murashige and Skoog(1962) และ Schenk and Hildebrandt(1972) โดยเตรียมแยกกันให้สารแต่ละชนิดมีความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 200 มล จากนั้นเตรียมน้ำยาผสมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักแต่ละสูตรให้มีความเข้มข้นมากกว่าสูตรมาตรฐาน 10 เท่า โดยใช้สารละลายเข้มข้น 1 โมลาร์ของสารเคมี ชนิดต่าง ๆ ตามตารางที่ 1 หน้า 17

ตารางที่ 1 ชนิด และปริมาณของสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักต่างๆ ในสูตร Vacin and Went(1949)ดัดแปลง Thomale GD(1954) Murashige and Skoog(1962) และ Schenk and Hildebrandt(1972)

สารเคมี	ปริมาณสารในสูตร (1) และปริมาณของสารละลายเข้มข้น 1 โมลาร์		ปริมาณสารในสูตร (2) และปริมาณของสารละลายเข้มข้น 1 โมลาร์				
	ที่ใช้ในการเตรียมสารละลายธาตุอาหารหลักเข้มข้น 10 เท่า (2) ของสูตรอาหารต่างๆ ปริมาตร 500 มล		ที่ใช้ในการเตรียมสารละลายธาตุอาหารหลักเข้มข้น 10 เท่า (2) ของสูตรอาหารต่างๆ ปริมาตร 500 มล				
	Vacin and Went ดัดแปลง		Thomale GD				
ปริมาณสารในสารละลายเข้มข้น	(1) มก/ล	(2) มล	(1) มก/ล	(2) มล	MS	Schenk and Hildebrandt	
1 โมลาร์ ปริมาตร 200 มล (ก)					(1) มก/ล	(2) มล	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	-	440	19.8	200
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	151	3.2	-	-	-	-	-
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	250	9.2	300	11.0	170	6.2	-
$\text{KNO}_3$	525	26.0	400	19.8	1,900	94.0	2,500
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250	5.1	-	-	370	7.5	400
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	-	110	2.1	-	-	-
$(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$	-	-	-	-	-	-	-
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	500	18.9	370	23.1	1,650	103.1	300
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	-	60	2.3	-	-	-



#### 4.2 การเตรียมธาตุอาหารรอง

เตรียมธาตุอาหารรองสูตร Murashige and Skoog (1962) โดยเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้นรวมกันให้ความเข้มข้นของสารมากกว่าสูตรมาตรฐาน 100 เท่า และเตรียมใหม่ปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล โดยใช้ปริมาณสารเคมีแต่ละชนิดตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ชนิด และปริมาณของสารเคมี ในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรองสูตร MS (1962)

สารเคมี	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในสารละลายเข้มข้น (100 เท่า) ปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล (มก)
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	22.300	2,230.0
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.600	860.0
$H_3BO_3$	6.200	620.0
KI	0.830	83.0
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.250	25.0
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025	2.5
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025	2.5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright © by Chiang Mai University

#### 4.3 การเตรียมอินทรีย์สาร

เตรียม วิตามิน glycine และ myo-inositol ในสูตร I โดยเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้นรวมกัน ให้ความเข้มข้นของสารมากกว่าในสูตร 100 เท่า เตรียมใหม่ปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล โดยใช้ปริมาณสารเคมีแต่ละชนิดตามตารางที่ 3 หน้า 19



ตารางที่ 3 ชนิด และปริมาณของสารเคมี ในสารละลายเข้มข้นของอินทรีย์สารสูตร I

สารเคมี	ปริมาณสารในสูตร I (มก/ล)	ปริมาณสารในสารละลายเข้มข้น(100 เท่า) ปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล (มก)
Glycine	2.00	200
Thiamine.HCl	0.25	25
Pyridoxin.HCl	0.25	25
Nicotinic acid	0.25	25
Myo-inositol	100.00	10,000

#### 4.4 การเตรียมสารละลายเหล็กในรูป $FeNa_2EDTA$

เตรียม  $FeNa_2EDTA$  ในสูตร MS(1962) ซึ่งประกอบด้วย  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  และ  $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$  โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมกัน ให้มีความเข้มข้นของสารมากกว่าในสูตรมาตรฐาน 100 เท่า เตรียมโดยชั่งสารแต่ละชนิดละลายในน้ำกลั่น ให้ปริมาตรสุดท้ายของแต่ละส่วนเป็น 500 มล แล้วจึงนำมาผสมไว้ในขวดเดียวกัน ตามตารางที่ 4 หน้า 20 ให้ขวดที่บรรจุสารละลายเข้มข้นไว้ด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ หนีบติดเพื่อป้องกันแสง

ตารางที่ 4 ชนิด และปริมาณของสารเคมี ในสารละลายหลักเข้มข้นสูตร MS(1962)

สารเคมี	ปริมาณสารในสูตร MS(1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในสารละลายเข้มข้น(100 เท่า) ปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล (ก)
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8	2.78
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.3	3.73

#### 4.5 การเตรียมสารกระตุ้นการเจริญเติบโต

##### 4.5.1 การเตรียม NAA

ซึ่ง NAA 10 มก ละลายด้วย absolute ethanol เล็กน้อยแล้วปรับให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น

##### 4.5.2 การเตรียม IBA

ซึ่ง IBA 20.3 มก ละลายด้วย absolute ethanol เล็กน้อยแล้วปรับให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น

##### 4.5.3 การเตรียม BAP

ซึ่ง BAP 22.5 มก ละลายด้วย 1 N KOH เล็กน้อย แล้วปรับให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น

#### 4.6 การเตรียมสารช่วยการเจริญเติบโต D-biotin

ซึ่ง D-biotin 10 มก ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล



## 5. วิธีการวิจัย

การศึกษาแบ่งออกเป็น 2 หัวข้อคือ

I. การศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการงอกของเมล็ด และการพัฒนาจนถึงระยะโปรโตคอร์ม แบ่งการศึกษาออกเป็น 5 การทดลองคือ

การทดลองที่ 1 การศึกษาหาอายุฝักที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเมล็ดในอาหารเหลว

### 1.1 อุปกรณ์การทดลอง

เมล็ดกล้วยไม้ร่องเท้านารีเหลืองปราจีนจากฝักอายุต่าง ๆ กัน

### 1.2 วิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำ 10 กรรมวิธี โดยการเพาะเมล็ดกล้วยไม้จากฝักอายุ 10 12 14 16 18 20 22 24 26 และ 28 สัปดาห์ หลังการผสมเกสร ลงในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงที่ประกอบด้วย

### 1. สูตรอาหารพื้นฐานซึ่งประกอบด้วย

1.1 ธาตุอาหารหลักในอาหารสูตร Vacin and Went (1949) ดัดแปลง

1.2 ธาตุอาหารรองในสูตรอาหาร MS (1962)

1.3 อินทรีย์สารในสูตร I

1.4  $\text{FeNa}_2\text{EDTA}$  ในสูตรอาหาร MS (1962)

1.5 น้ำตาลซูโครส 20 ก/ล

2. D-biotin 1 มก/ล

3. NAA 1 มก/ล

4. Peptone 1 ก/ล

5. น้ำมะพร้าว 100 มล/ล

### 1.3 วิธีการเตรียมอาหารสำหรับเพาะเมล็ด

การเตรียมอาหารสำหรับเพาะเมล็ดปริมาตร 100 มล ทำได้โดยทำตาม

ขั้นตอนต่อไปนี้

- 1.3.1 เติมน้ำกลั่นในขวดแก้ววัดปริมาตรขนาด 100 มล ประมาณ 20 มล
- 1.3.2 เติมน้ำละลายเข็มชั้น( 10 เท่า) ของธาตุอาหารหลักในสูตรอาหาร Vacin and Went(1949)ดัดแปลง ปริมาตร 10 มล ลงไป เขย่าให้เข้ากัน
- 1.3.3 เติมน้ำละลายเข็มชั้น(100 เท่า) ของธาตุอาหารรองในสูตรอาหาร MS(1962) ปริมาตร 1 มล ลงไป เขย่าให้เข้ากัน
- 1.3.4 เติมน้ำละลายเข็มชั้น(100 เท่า) ของอินทรีย์สารในสูตร I ปริมาตร 1 มล ลงไป เขย่าให้เข้ากัน
- 1.3.5 เติมน้ำละลายเข็มชั้น(100 เท่า) ของ  $FeNa_2EDTA$  ในสูตรอาหาร MS ปริมาตร 1 มล ลงไป เขย่าให้เข้ากัน
- 1.3.6 เติมน้ำละลายเข็มชั้น( 10 มก/100 มล ) ของ D-biotin ปริมาตร 1 มล ลงไป เขย่าให้เข้ากัน
- 1.3.7 เติมน้ำละลายเข็มชั้น(10 มก/100 มล) ของ NAA ปริมาตร 1 มล ลงไป เขย่าให้เข้ากัน
- 1.3.8 เติมน้ำมะพร้าวปริมาตร 10 มล
- 1.3.9 เติมน้ำ peptone 100 มก
- 1.3.10 เติมน้ำตาลซูโครส 2 ก
- 1.3.11 ปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล
- 1.3.12 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง(pH) ของอาหารเหลวให้เป็น 6.5 บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 50 มล ขวดละ 10 มล ปิดผนึกด้วยแผ่นพลาสติกทึบร้อน และหุ้มด้วยกระดาษอีกชั้น และใช้ยางรัด นำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ /ตารางนิ้ว(ป/ตร น) เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้จนเย็นก่อนนำไปใช้



หลังจากที่ทำการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ลงในแต่ละขวดแล้ว นำมาปิดผนึกด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ให้มิดชิด นำไปแช่ยาบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ทำการทดลองกรรมวิธีละอย่างน้อย 3 ข้าง

#### 1.4 การบันทึกผลการทดลอง

1.4.1 วัดขนาดความกว้าง และความยาวของเมล็ด และคันทะ โดยการสุ่มวัดจากจำนวน 10 เมล็ดต่อข้าง สัปดาห์ละ 1 ครั้ง ตั้งแต่เริ่มการทดลอง บันทึกผลนาน 4 ถึง 8 สัปดาห์

1.4.2 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ทำการสุ่ม(5 ครั้ง) โดยเอียงขวดไปมา แล้วตั้งทิ้งไว้จนหนึ่ง ให้คะแนนความงอกของเมล็ดภายในพื้นที่สุ่ม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ส่องกลับ โดยคิดเป็นร้อยละ ซึ่งแบ่งออกเป็น 5 ระดับดังนี้

1. เมล็ดไม่งอก
2. เมล็ดงอกระดับน้อย (งอกน้อยกว่า 25 %)
3. เมล็ดงอกระดับปานกลาง (งอกประมาณ 25-50 %)
4. เมล็ดงอกระดับมาก (งอกประมาณ 51-75 %)
5. เมล็ดงอกระดับมากที่สุด (งอกมากกว่า 75 %)

#### การทดลองที่ 2 การเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ด ในอาหารเหลว

##### 2.1 อุปกรณ์การทดลอง

เมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีนจากฝักอายุ 28 สัปดาห์

##### 2.2 วิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำ 3 กรรมวิธี โดยการเพาะเมล็ดกล้วยไม้จากแต่ละฝักลงในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงตามการทดลองที่ 1 ที่ดัดแปลงโดยใช้ธาตุอาหารหลักแตกต่างกัน 3 สูตรคือ

1. ธาตุอาหารหลักสูตร Vacin and Went (1949) ดัดแปลง
2. ธาตุอาหารหลักสูตร Thomale GD (1954)
3. ธาตุอาหารหลักสูตร Murashige and Skoog (1962)

### 2.3 วิธีการเตรียมอาหารสำหรับเพาะเมล็ด

เตรียมอาหารสำหรับเพาะเมล็ดในแต่ละกรรมวิธี ( 3 กรรมวิธี )

กรรมวิธีละ 100 มล ทำโดย

2.3.1 เติมน้ำกลั่นลงในขวดแก้ววัดปริมาตรขนาด 100 มล ประมาณ 20 มล

2.3.2 เติมน้ำละลายเข้มข้น ( 100 เท่า ) ของธาตุอาหารหลัก ในอาหารสูตรต่าง ๆ ตามกรรมวิธีต่าง ๆ ที่ใช้ทดลองคือ

2.3.2.1 สารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก ในอาหารสูตร Vacin and Went (1949) ดัดแปลง ปริมาตร 10 มล (กรรมวิธีที่ 1)

2.3.2.2 สารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก ในอาหารสูตร Thomale GD (1954) ปริมาตร 10 มล (กรรมวิธีที่ 2)

2.3.2.3 สารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก ในอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962) ปริมาตร 10 มล (กรรมวิธีที่ 3)

สำหรับขั้นตอนต่อไปของแต่ละกรรมวิธี ปฏิบัติเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 1.3.3

ถึง 1.3.12 ของการเตรียมอาหารสำหรับเพาะเมล็ดในการทดลองที่ 1

หลังจากที่ทำการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ลงในแต่ละขวดแล้ว นำมาปิดผนึกด้วย

กระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ให้มิดชิด นำไปแช่ในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที

ทำการทดลองกรรมวิธีละอย่างน้อย 3 ซ้ำ



## 2.4 การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกผลการทดลองโดยปฏิบัติเช่นเดียวกับการบันทึกผลในการทดลองที่ 1

### การทดลองที่ 3 การหาระดับของ Peptone ที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดในอาหารเหลว

#### 3.1 อุปกรณ์การทดลอง

เมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีนจากฝักอายุ 28 สัปดาห์

#### 3.2 วิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำ 5 กรรมวิธี โดยการเพาะเมล็ดกล้วยไม้จากแต่ละฝักลงในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงตามการทดลองที่ 1 ที่ดัดแปลงโดยเติม Peptone ที่ระดับต่าง ๆ กันรวม 5 ระดับ ตามกรรมวิธีต่าง ๆ ที่ใช้ทดลองคือ

กรรมวิธีที่ 1	เติม Peptone	0	ก/ล
กรรมวิธีที่ 2	เติม Peptone	0.5	ก/ล
กรรมวิธีที่ 3	เติม Peptone	1.0	ก/ล
กรรมวิธีที่ 4	เติม Peptone	2.0	ก/ล
กรรมวิธีที่ 5	เติม Peptone	3.0	ก/ล

#### 3.3 วิธีการเตรียมอาหารสำหรับเพาะเมล็ด

เตรียมอาหารสำหรับเพาะเมล็ดในแต่ละกรรมวิธี ( 5 กรรมวิธี )

กรรมวิธีละ 100 มล โดยปฏิบัติตามขั้นตอนตามวิธีการเตรียมอาหารในการทดลองที่ 1 แต่การปฏิบัติในขั้นตอนที่ 1.3.9 ( การเติม peptone ) จะมีข้อแตกต่างออกไปดังนี้คือ

กรรมวิธีที่ 1	เติม Peptone	0	ก
กรรมวิธีที่ 2	เติม Peptone	0.05	ก
กรรมวิธีที่ 3	เติม Peptone	0.10	ก
กรรมวิธีที่ 4	เติม Peptone	0.20	ก
กรรมวิธีที่ 5	เติม Peptone	0.30	ก

หลังจากทำการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ลงในแต่ละขวดแล้ว นำมาปิดผนึกด้วย  
กระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ให้มิดชิด นำไปแช่ยาบมเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที  
ทำการทดลองกรรมวิธีละอย่างน้อย 3 ข้าง

### 3.4 การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกผลการทดลอง โดยปฏิบัติเช่นเดียวกับการบันทึกผลในการทดลองที่ 1

### การทดลองที่ 4 การเปรียบเทียบความต้องการแสงในการงอกของเมล็ด ในอาหารเหลว

#### 4.1 อุปกรณ์การทดลอง

เมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีนจากฝักอายุ 28 สัปดาห์

#### 4.2 วิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำ 5 กรรมวิธี โดยการเพาะเมล็ด  
กล้วยไม้จากแต่ละฝักลงในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงตามการทดลองที่ 1 และจัดให้ได้รับสภาพ  
แสงแตกต่างกันดังนี้คือ

กรรมวิธีที่ 1 ทำการเพาะเลี้ยงในสภาพที่ ให้ได้รับ แสงสว่างจากหลอด  
ฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ นาน  
24 ชม/ว ตลอดการทดลอง

กรรมวิธีที่ 2 ทำการเพาะเลี้ยงในสภาพมืดนาน 1 สัปดาห์ จึงเปิด  
กระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ที่หุ้ม ไขว้ออกเพื่อให้ได้รับแสงสว่าง

กรรมวิธีที่ 3 ทำการเพาะเลี้ยงในสภาพมืดนาน 2 สัปดาห์ จึงเปิด  
กระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ที่หุ้ม ไขว้ออกเพื่อให้ได้รับแสงสว่าง

กรรมวิธีที่ 4 ทำการเพาะเลี้ยงในสภาพมืดนาน 3 สัปดาห์ จึงเปิด  
กระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ที่หุ้ม ไขว้ออกเพื่อให้ได้รับแสงสว่าง

กรรมวิธีที่ 5 ทำการเพาะเลี้ยงในสภาพมืดนาน 4 สัปดาห์ จึงเปิด  
กระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ที่หุ้ม ไขว้ออกเพื่อให้ได้รับแสงสว่าง

#### 4.3 วิธีการเตรียมอาหารสำหรับเพาะเมล็ด



เตรียมอาหารสำหรับเพาะเมล็ด โดยการปฏิบัติตามขั้นตอนวิธีการเตรียมอาหารในการทดลองที่ 1

หลังจากที่ทำการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ลงในแต่ละขวดแล้ว ปิดผนึกด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ให้มิดชิด (ยกเว้นกรรมวิธีที่ 1) นำไปแช่ในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบประมาณ 100 รอบต่อนาที โดยจัดให้ได้รับสภาพแสงแตกต่างกันตามกรรมวิธีทดลองที่แสดงข้างต้น ทำการทดลองกรรมวิธีละอย่างน้อย 3 ข้าง

#### 4.4 การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกผลการทดลอง โดยปฏิบัติเช่นเดียวกับการบันทึกผลในการทดลองที่ 1

**การทดลองที่ 5 การหาระดับความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดในอาหารเหลว**

##### 5.1 อุปกรณ์การทดลอง

เมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีนจากฝักอายุ 28 สัปดาห์

##### 5.2 วิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำ 5 กรรมวิธี โดยการเพาะเมล็ดกล้วยไม้จากแต่ละฝักลงในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงตามการทดลองที่ 1 ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเหลวแตกต่างกัน 5 ระดับ ตามกรรมวิธีต่าง ๆ ที่ใช้ทดลองคือ

กรรมวิธีที่ 1 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเท่ากับ 5.0

กรรมวิธีที่ 2 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเท่ากับ 5.5

กรรมวิธีที่ 3 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเท่ากับ 5.7

กรรมวิธีที่ 4 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเท่ากับ 6.0

กรรมวิธีที่ 5 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเท่ากับ 6.5

##### 5.3 วิธีการเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเมล็ด

เตรียมอาหารเพาะเมล็ดสำหรับแต่ละกรรมวิธี ( 5 กรรมวิธี )

กรรมวิธีละ 100 มล โดยการปฏิบัติตามขั้นตอนตามวิธีการเตรียมอาหารในการทดลองที่ 1

แต่การปฏิบัติในขั้นตอนที่ 1.3.12 (การปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง) มีข้อแตกต่างกันออกไปโดยที่ทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเหลวสำหรับแต่ละกรรมวิธีใหม่ค่า 5.0 5.5 5.7 6.0 และ 6.5 ตามลำดับ

หลังจากที่ทำการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ลงในแต่ละขวดแล้ว นำมาปิดผนึกขวดด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ให้มิดชิดนำไปแช่ยาบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ทำการทดลองกรรมวิธีละอย่างน้อย 3 ซ้ำ

#### 5.4 การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกผลการทดลองโดยปฏิบัติเช่นเดียวกับการบันทึกผลในการทดลองที่ 1

II. การศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นต้นกล้าของโปรโตคอร์ัม แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 การทดลองคือ

การทดลองที่ 6 การเปรียบเทียบผลของการเติมกล้วยหอมบด และถ่านผงซึ่งต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ัม

#### 6.1 อุปกรณ์การทดลอง

โปรโตคอร์ัมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน ที่ได้จากการเพาะเมล็ดอายุ 28 สัปดาห์ ในอาหารเหลว

#### 6.2 วิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมสี่มุมสมบูรณ์ ( Factorial in CRD ) โดยมี 2 ปัจจัยคือ กล้วยหอมบด 2 ระดับ และถ่านผง 2 ระดับ รวมเป็น 4 กรรมวิธี ทดลองกรรมวิธีละอย่างน้อย 3 ซ้ำ ทำการย้ายโปรโตคอร์ัมที่ได้จากการเพาะเมล็ดในอาหารเหลวลงบนอาหารวันสูตรดัดแปลงที่ประกอบด้วย

#### 1. สูตรอาหารพื้นฐานซึ่งประกอบด้วย

1.1 ธาตุอาหารหลักในสูตรอาหาร Schenk and Hildebrandt

(1972)



1.2 ธาตุอาหารรองในสูตรอาหาร MS (1962)

1.3 อินทรีย์สารในสูตร I

1.4  $\text{FeNa}_2\text{EDTA}$  ในสูตรอาหาร MS (1962)

1.5 IBA 1.015 มก/ล

1.6 BAP 0.28125 มก/ล

1.7 น้ำตาลซูโครส 30 ก/ล

1.8 วัช 6 ก/ล

ทำการดัดแปลงสูตรอาหารพื้นฐานโดยเติมกล้วยหอมบด 2 ระดับคือ 0 และ 50 ก/ล และ/หรือถ่านผง 2 ระดับคือ 0 และ 2 ก/ล ตามกรรมวิธีต่างๆ ที่ใช้ทดลองคือ

กรรมวิธีที่ 1 เติมกล้วยหอมบด 0 ก/ล ถ่านผง 0 ก/ล

กรรมวิธีที่ 2 เติมกล้วยหอมบด 0 ก/ล ถ่านผง 2 ก/ล

กรรมวิธีที่ 3 เติมกล้วยหอมบด 50 ก/ล ถ่านผง 0 ก/ล

กรรมวิธีที่ 4 เติมกล้วยหอมบด 50 ก/ล ถ่านผง 2 ก/ล

6.3 วิธีการเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงโปรโตคอร์ม

ขั้นตอนในการเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงโปรโตคอร์ม ในแต่ละกรรมวิธี

( 4 กรรมวิธี ) กรรมวิธีละ 500 มล ทำโดย

6.3.1 เติมน้ำกลั่นลงในขวดแก้ววัดปริมาตรขนาด 500 มล ประมาณ 100 มล

6.3.2 เติมน้ำละลายเข้มข้น (10 เท่า) ของธาตุอาหารหลักในสูตรอาหาร Schenk and Hildebrandt (1972) ปริมาตร 50 มล ลงไป เขย่าให้เข้ากัน

6.3.3 เติมน้ำละลายเข้มข้น (100 เท่า) ของธาตุอาหารรองในสูตรอาหาร MS (1962) ปริมาตร 5 มล ลงไป เขย่าให้เข้ากัน

6.3.4 เติมน้ำละลายเข้มข้น ( 100 เท่า) ของอินทรีย์สารในสูตร I

ปริมาตร 5 มล ลงไป เขย่าให้เข้ากัน

6.3.5 เติมสารละลายเข้มข้น(100 เท่า) ของ  $\text{FeNa}_2\text{EDTA}$  ใน  
สูตรอาหาร MS ปริมาตร 5 มล ลงไป เขย่าให้เข้ากัน

6.3.6 เติมสารละลายเข้มข้น(20.3 มก/100 มล)ของ IBA ปริมาตร  
2.5 มล ลงไป เขย่าให้เข้ากัน

6.3.7 เติมสารละลายเข้มข้น(22.5 มก/100 มล)ของ BAP ปริมาตร  
0.625 มล ลงไป เขย่าให้เข้ากัน

6.3.8 เติมน้ำตาลซูโครส 15 ก

6.3.9 เติมกล้วยหอมมด และถ่าน ดังนี้คือ

6.3.9.1 เติมกล้วยหอมมด 0 ก ถ่านผง 0 ก

6.3.9.2 เติมกล้วยหอมมด 0 ก ถ่านผง 1 ก

6.3.9.3 เติมกล้วยหอมมด 25 ก ถ่านผง 0 ก

6.3.9.4 เติมกล้วยหอมมด 25 ก ถ่านผง 1 ก

6.3.10 ปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 500 มล

6.3.11 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารให้เป็น 5.7

6.3.12 เติมน้ำ 3 ก

6.3.13 นำไปต้มจนกระทั่งวันละลายดีแล้ว จึงทำการบรรจุในขวด

ปากกว้าง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7.5 ซม สูง 12.5 ซม

ปริมาตรขวดละ 50 มล ปิดปากขวดด้วยแผ่นพลาสติกทึบร้อน

และฝาโลหะ หุ้มด้วยกระดาษอีกชั้นหนึ่งและใช้ยางรัด นำไปนึ่ง

ในหม้อนึ่งความดันที่ความดัน 15 ป/ตร น เป็นเวลา 20 นาที

ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเย็นก่อนนำไปใช้

6.4 การบันทึกผลการทดลอง

6.4.1 บันทึกระยะเวลาที่โปรโตคอร์มเริ่มมีสีเขียว และโปรโตคอร์ม

เริ่มมีใบยอด



6.4.2 พิจารณาความมีชีวิตรอดของ ไพรโตคอร์ม โดยดูจากการที่  
ไพรโตคอร์ม ไม่เปลี่ยนเป็นสีเหลือง หรือสีน้ำตาล

6.4.3 บันทึกขนาดทรงพุ่มของต้นกล้า

6.4.4 บันทึกคุณภาพของต้นกล้า โดยพิจารณาจาก สี และเนื้อผิวของใบ

6.4.5 บันทึกระยะเวลาที่ต้นกล้าเริ่มเกิดราก

### การทดลองที่ 7 การหาระดับน้ำตาล และน้ำมะพร้าวที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของ ไพรโตคอร์ม

#### 7.1 อุปกรณ์การทดลอง

ไพรโตคอร์มของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน ที่ได้จาก

การเพาะเมล็ดอายุ 28 สัปดาห์ ในอาหารเหลว

#### 7.2 วิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมสี่มุมสมบูรณ์ โดยมี 2 ปัจจัยคือ น้ำตาล  
ซูโครส 4 ระดับ และน้ำมะพร้าว 3 ระดับ รวมเป็น 12 กรรมวิธี ทดลองกรรมวิธีละอย่างน้อย  
3 ซ้ำ ทำการย้ายไพรโตคอร์มที่ได้จากการเพาะในอาหารเหลว ลงบนอาหารวันสูตรพื้นฐาน  
ที่ใช้ในการทดลองที่ 6 ที่ตัดแปลงโดยเติมน้ำตาลซูโครส 4 ระดับคือ 0 10 20 และ 30  
ก/ล และ/หรือน้ำมะพร้าว 3 ระดับคือ 0 100 และ 200 มล/ล ตามกรรมวิธีต่าง ๆ  
ที่ใช้ทดลองคือ

กรรมวิธีที่	1	เติมน้ำตาลซูโครส	0	ก	น้ำมะพร้าว	0	มล
กรรมวิธีที่	2	เติมน้ำตาลซูโครส	10	ก	น้ำมะพร้าว	0	มล
กรรมวิธีที่	3	เติมน้ำตาลซูโครส	20	ก	น้ำมะพร้าว	0	มล
กรรมวิธีที่	4	เติมน้ำตาลซูโครส	30	ก	น้ำมะพร้าว	0	มล
กรรมวิธีที่	5	เติมน้ำตาลซูโครส	0	ก	น้ำมะพร้าว	100	มล
กรรมวิธีที่	6	เติมน้ำตาลซูโครส	10	ก	น้ำมะพร้าว	100	มล
กรรมวิธีที่	7	เติมน้ำตาลซูโครส	20	ก	น้ำมะพร้าว	100	มล

กรรมวิธีที่ 8	เติมน้ำตาลซูโครส	30 ก	น้ำมะพร้าว	100 มล
กรรมวิธีที่ 9	เติมน้ำตาลซูโครส	0 ก	น้ำมะพร้าว	200 มล
กรรมวิธีที่ 10	เติมน้ำตาลซูโครส	10 ก	น้ำมะพร้าว	200 มล
กรรมวิธีที่ 11	เติมน้ำตาลซูโครส	20 ก	น้ำมะพร้าว	200 มล
กรรมวิธีที่ 12	เติมน้ำตาลซูโครส	30 ก	น้ำมะพร้าว	200 มล

### 7.3 วิธีการเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงโปรโตคอร์ม

ขั้นตอนในการเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงโปรโตคอร์ม ในแต่ละกรรมวิธี ( 12 กรรมวิธี ) กรรมวิธีละ 500 มล ทำโดยการปฏิบัติตามขั้นตอนตามวิธีการเตรียมอาหารในการทดลองที่ 6 ยกเว้นการปฏิบัติในขั้นตอนที่ 6.3.9 และการปฏิบัติในขั้นตอนที่ 6.3.8 จะมีข้อแตกต่างออกไปดังนี้คือ

เติมน้ำตาลซูโครส และน้ำมะพร้าว ดังนี้คือ

กรรมวิธีที่ 1	เติมน้ำตาลซูโครส	0 ก	น้ำมะพร้าว	0 มล
กรรมวิธีที่ 2	เติมน้ำตาลซูโครส	5 ก	น้ำมะพร้าว	0 มล
กรรมวิธีที่ 3	เติมน้ำตาลซูโครส	10 ก	น้ำมะพร้าว	0 มล
กรรมวิธีที่ 4	เติมน้ำตาลซูโครส	15 ก	น้ำมะพร้าว	0 มล
กรรมวิธีที่ 5	เติมน้ำตาลซูโครส	0 ก	น้ำมะพร้าว	50 มล
กรรมวิธีที่ 6	เติมน้ำตาลซูโครส	5 ก	น้ำมะพร้าว	50 มล
กรรมวิธีที่ 7	เติมน้ำตาลซูโครส	10 ก	น้ำมะพร้าว	50 มล
กรรมวิธีที่ 8	เติมน้ำตาลซูโครส	15 ก	น้ำมะพร้าว	50 มล
กรรมวิธีที่ 9	เติมน้ำตาลซูโครส	0 ก	น้ำมะพร้าว	100 มล
กรรมวิธีที่ 10	เติมน้ำตาลซูโครส	5 ก	น้ำมะพร้าว	100 มล
กรรมวิธีที่ 11	เติมน้ำตาลซูโครส	10 ก	น้ำมะพร้าว	100 มล
กรรมวิธีที่ 12	เติมน้ำตาลซูโครส	15 ก	น้ำมะพร้าว	100 มล

### 7.4 การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกผลการทดลอง โดยปฏิบัติเช่นเดียวกับการบันทึกผลในการทดลองที่ 6