

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. การเตรียมสารละลายอาหารเข้มข้นสูตรมูราซีเกะและสก็๊วก

1.1 การเตรียมสารละลายเข้มข้นสูตรมูราซีเกะและสก็๊วก เตรียมเป็นสารละลายเข้มข้นรวม 4 Stock ดังนี้

Stock solution A

NH_4NO_3	16.5	กรัม/ลิตร
KNO_3	19.0	กรัม/ลิตร
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.4	กรัม/ลิตร
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.7	กรัม/ลิตร
KH_2PO_4	1.7	กรัม/ลิตร

Stock solution B

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.69	กรัม/ลิตร
H_3BO_3	0.71	กรัม/ลิตร
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.614	กรัม/ลิตร
KI	0.083	กรัม/ลิตร
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025	กรัม/ลิตร
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0025	กรัม/ลิตร
$\text{CaSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0025	กรัม/ลิตร

Stock solution C

$\text{Na}_2 - \text{EDTA}$	3.725	กรัม/ลิตร
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.785	กรัม/ลิตร

Stock solution C

Glycine	0.2	กรัม/ลิตร
Nicotinic acid	0.05	กรัม/ลิตร
Pyridoxine	0.05	กรัม/ลิตร

Thiamine	0.01	กรัม/ลิตร
Inositol	10.0	กรัม/ลิตร

1.2 การเตรียมน้ำมะพร้าว

ใช้น้ำมะพร้าวน้ำหอม โดยเลือกในระยะที่ยังอ่อนอยู่ (สังเกตจากมะพร้าวที่มีน้ำหนักมาก เพราะมีน้ำมากและเนื้อมะพร้าวเป็นวุ้น) เทน้ำมะพร้าวใส่ปิกเกอร์ กรองด้วยผ้าขาวบาง

1.3 การเตรียมน้ำสกัดมันฝรั่ง

ปอกเปลือกมันฝรั่ง ล้างน้ำให้สะอาด ซึ่งให้น้ำหนักตามที่ต้องการต่อการเตรียมน้ำอาหาร 1 ลิตร หั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปต้มกับน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร เคี่ยวด้วยไฟอ่อน ๆ จนมันฝรั่งสุก แล้วนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง โดยเอาเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำมาใช้เตรียมน้ำอาหารตามปัจจัยที่ศึกษา

2. การเตรียมน้ำอาหารเพาะเลี้ยง

2.1 อาหารเหลวสูตรดัดแปลงมูราชิเกะและสก็ก (MS) ที่ใช้ในการทดลองที่ 1

อาหารเหลวสูตรดัดแปลงที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณ protocorm - like body (plbs) ในการทดลองที่ 1 เป็นอาหารเหลวสูตรดัดแปลง MS (1962) ซึ่งดัดแปลงโดยใส่น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร ใส่น้ำตาล 0 , 10 , 20 และ 30 กรัมต่อลิตร อาหารที่ใช้สำหรับการทดลองที่ 1 จึงมี 4 สูตรด้วยกันเรียกอาหาร 4 สูตรนี้ว่า MS 1/1 MS 1/2 MS 1/3 และ MS 1/4 ตามลำดับ

อาหารสูตร MS 1/1 เป็นอาหารเหลวสูตรดัดแปลง MS (1962) ซึ่งดัดแปลงโดยใส่น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตรและใส่น้ำตาล 0 กรัมต่อลิตร การเตรียมน้ำอาหารสูตร MS 1/1 จำนวน 1 ลิตรเตรียมตามขั้นตอนดังนี้

1) เติมน้ำละลายเข้มข้นสูตร MS (ข้อ 1.1) stock solution A 100 มิลลิลิตร stock solution B 10 มิลลิลิตร stock solution C 10 มิลลิลิตร และ stock solution D 10 มิลลิลิตร ลงในปิกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร

2) เติมน้ำมะพร้าวจากข้อ (1.2) 150 มิลลิลิตร

3) เติมน้ำตาลทรายขาว 0 กรัม

4) เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

5) ปรับ pH ให้ได้ 5.6 – 5.8 โดยใช้ HCl 1 N หรือ KOH 1 N

6) เทอาหารใส่ขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร จำนวน 40 มิลลิลิตรต่อขวด

7) ใช้พลาสติกใสขนาด 15x 15 เซนติเมตรปิดปากขวด มัดด้วยยางวง 2 เส้น แล้วหุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อใน autoclave ภายใต้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที แล้วตั้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปใช้

อาหารสูตร MS 1/2 เป็นอาหารเหลวสูตรดัดแปลง MS (1962) ซึ่งดัดแปลงโดยใส่น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตรและใส่น้ำตาล 10 กรัมต่อลิตร การเตรียมอาหารสูตร MS 1/2 จำนวน 1 ลิตร เตรียมได้ดังนี้

เตรียมเหมือนกับอาหารสูตร MS 1/1 จะต่างกันก็ตรงที่ว่าในอาหารสูตรนี้ต้องเติมน้ำตาลทรายขาวลงไปจำนวน 10 กรัมต่อลิตรในขั้นตอนที่ 3

อาหารสูตร MS 1/3 เป็นอาหารเหลวสูตรดัดแปลง MS (1962) ซึ่งดัดแปลงโดยใส่น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร ใส่น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร การเตรียมอาหารสูตร MS 1/3 จำนวน 1 ลิตร เตรียมตามขั้นตอนดังนี้

เตรียมเหมือนกับอาหารสูตร MS 1/1 จะต่างกันก็ตรงที่ว่าในอาหารสูตรนี้ต้องเติมน้ำตาลทรายขาวลงไปจำนวน 20 กรัมต่อลิตร ในขั้นตอนที่ 3

อาหารสูตร MS 1/4 เป็นอาหารเหลวสูตรดัดแปลง MS (1962) ซึ่งดัดแปลงโดยใส่น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร และใส่น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร การเตรียมอาหารสูตร MS 1/4 จำนวน 1 ลิตร เตรียมตามขั้นตอนดังนี้

เตรียมเหมือนสูตร MS 1/1 จะต่างกันก็ตรงที่ว่าในอาหารสูตรนี้ต้องเติมน้ำตาลทรายขาวลงไปจำนวน 30 กรัมต่อลิตรในขั้นตอนที่ 3

2.2 อาหารแข็งสูตรดัดแปลงมูราซิเกะและสก็กก (MS) ที่ใช้ในการทดลองที่ 2

อาหารแข็งสูตรที่ใช้สำหรับการชักนำ protocorm-like body (plbs) ให้เกิดเป็นต้นในการทดลองที่ 2 เป็นอาหารแข็งสูตรดัดแปลง MS (1962) ซึ่งดัดแปลงโดยการใส่วุ้น 7.8 กรัมต่อลิตร ผงถ่าน 0.5 กรัมต่อลิตร ใส่น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร ใส่น้ำสกัดมันฝรั่งแตกต่างกันเป็น 2 ระดับ (100 และ 200 มิลลิลิตรต่อลิตร) และใส่น้ำตาลทรายขาวต่างกันเป็น 4 ระดับ (0 , 10 , 20 และ 30 กรัมต่อลิตร) อาหารที่ใช้สำหรับการทดลองที่ 2 จึงมี 8 สูตรด้วยกัน เรียกอาหาร 8 สูตรนี้ว่า MS 2/1.1 MS 2/1.2 MS 2/1.3 MS 2/1.4 MS 2/2.1 MS 2/2.2 MS 2/2.3 และ MS 2/2.4 ตามลำดับ

- MS 2/1.1 (MS + น้ำมะพร้าว 150 มล/ล + น้ำสกัดมันฝรั่ง 100 ก/ล + น้ำตาล 0 ก/ล + ผงถ่าน 0.5 ก/ล + ไขมัน 7.8 ก/ล)
- MS 2/1.2 (MS + น้ำมะพร้าว 150 มล/ล + น้ำสกัดมันฝรั่ง 100 ก/ล + น้ำตาล 10 ก/ล + ผงถ่าน 0.5 ก/ล + ไขมัน 7.8 ก/ล)
- MS 2/1.3 (MS + น้ำมะพร้าว 150 มล/ล + น้ำสกัดมันฝรั่ง 100 ก/ล + น้ำตาล 20 ก/ล + ผงถ่าน 0.5 ก/ล + ไขมัน 7.8 ก/ล)
- MS 2/1.4 (MS + น้ำมะพร้าว 150 มล/ล + น้ำสกัดมันฝรั่ง 100 ก/ล + น้ำตาล 30 ก/ล + ผงถ่าน 0.5 ก/ล + ไขมัน 7.8 ก/ล)
- MS 2/2.1 (MS + น้ำมะพร้าว 150 มล/ล + น้ำสกัดมันฝรั่ง 200 ก/ล + น้ำตาล 0 ก/ล + ผงถ่าน 0.5 ก/ล + ไขมัน 7.8 ก/ล)
- MS 2/2.2 (MS + น้ำมะพร้าว 150 มล/ล + น้ำสกัดมันฝรั่ง 200 ก/ล + น้ำตาล 10 ก/ล + ผงถ่าน 0.5 ก/ล + ไขมัน 7.8 ก/ล)
- MS 2/2.3 (MS + น้ำมะพร้าว 150 มล/ล + น้ำสกัดมันฝรั่ง 200 ก/ล + น้ำตาล 20 ก/ล + ผงถ่าน 0.5 ก/ล + ไขมัน 7.8 ก/ล)
- MS 2/2.4 (MS + น้ำมะพร้าว 150 มล/ล + น้ำสกัดมันฝรั่ง 200 ก/ล + น้ำตาล 30 ก/ล + ผงถ่าน 0.5 ก/ล + ไขมัน 7.8 ก/ล)

การเตรียมอาหารสูตร MS 2/1.1 จำนวน 1 ลิตร เตรียมได้ดังนี้

- 1) เติมสารละลายเข้มข้นสูตร MS (ข้อ 1.1) stock solution A 100 มิลลิลิตร stock solution B 10 มิลลิลิตร stock solution C 10 มิลลิลิตร และ stock solution D 10 มิลลิลิตร ลงใน ปีกเกอร์ 1,000 มิลลิลิตร
- 2) เติมน้ำมะพร้าวซึ่งเตรียมตามข้อ (1.2) 150 มิลลิลิตร
- 3) เติมน้ำสกัดมันฝรั่ง 100 กรัม (เตรียมตามข้อ 1.3)
- 4) เติมน้ำตาล 0 กรัม
- 5) เติมผงถ่าน 0.5 กรัม
- 6) เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร
- 7) ปรับ pH ให้ได้ 5.6 – 5.8 โดยใช้ HCl 1 N หรือ KOH 1 N
- 8) เทอาหารใส่ภาชนะยกขึ้นตั้งบนเตาไฟพร้อมเติมไขมันลงไป 7.8 กรัม
- 9) กวนไปมาจนไขมันละลายหมดและส่วนผสมใส

10) เทออาหารใส่ขวดขนาด 8 ออนซ์ ขวดละ 30 มิลลิลิตร แล้วปิดฝาขวดให้แน่น ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อใน autoclave ภายใต้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปใช้

การเตรียมอาหารสูตร MS 2/1.2 MS 2/1.3 และ MS 2/1.4 เตรียมเช่นเดียวกับอาหารสูตร MS 2/1.1 เพียงแต่น้ำตาลที่ใส่ลงไปในการอาหารสูตร MS 2/1.2 MS 2/1.3 และ MS 2/1.4 จะต่างกันเป็น 10 กรัม 20 กรัม และ 30 กรัมตามลำดับ

การเตรียมอาหารสูตร MS 2/2.1 จำนวน 1 ลิตรเตรียมได้ดังนี้

1) เติมสารละลายเข้มข้นสูตร MS (ข้อ 1.1) stock solution A 100 มิลลิลิตร stock solution B 10 มิลลิลิตร stock solution C 10 มิลลิลิตร และ stock solution D 10 มิลลิลิตร ลงไปในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร

2) เติมน้ำมะพร้าวซึ่งเตรียมตามข้อ (1.2) 150 มิลลิลิตร

3) เติมน้ำสกัดมันฝรั่ง 200 กรัม (เตรียมตามข้อ 1.3)

4) เติมน้ำตาล 0 กรัม

5) เติมผงถ่าน 0.5 กรัม

6) เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

7) ปรับ pH ให้ได้ 5.6 – 5.8 โดยใช้ HCl 1 N หรือ KOH 1 N

8) เทออาหารใส่ภาชนะยกขึ้นตั้งบนเตาไฟพร้อมเติมน้ำลงไป 7.8 กรัม

9) กวนไปมาจนนุ่นละลายหมดและส่วนผสมใส

10) เทออาหารใส่ขวด 8 ออนซ์ ขวดละ 30 มิลลิลิตร แล้วปิดฝาขวดให้แน่นก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อใน autoclave ภายใต้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปใช้

การเตรียมอาหารสูตร MS 2/2.2 MS 2/2.3 และ MS 2/2.4 เตรียมเช่นเดียวกับอาหารสูตร MS 2/2.1 เพียงแต่น้ำตาลที่ใส่ลงไปในการอาหารสูตร MS 2/2.2 MS 2/2.3 และ MS 2/2.4 จะต่างกันเป็น 10 กรัม 20 กรัม และ 30 กรัม ตามลำดับ

3. การฆ่าเชื้อ

3.1 อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงซึ่งบรรจุไว้ในขวด เครื่องมือต่าง ๆ ที่มีขนาดเล็กและทำด้วยโลหะ เช่น มีดผ่าตัด ปากคีบ และข้อจุกสกร ใช้อะลูมิเนียมฟอยด์ห่อให้มีชนิดแยกเป็น

ขึ้น ๆ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อใน autoclave ภายใต้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วนาน 15 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปใช้

3.2 ตู้อ่างเนื้อเยื่อหรือตู้กรองอากาศบริสุทธิ์ รวมถึงเครื่องมือและอุปกรณ์ที่อยู่ภายในตู้ และที่จะนำไป เช่น ขวดบรรจุอาหาร ตะเกียงแอลกอฮอล์ ที่วางหลอดแก้วบรรจุแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์และที่วางเครื่องมือ เช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ให้ทั่ว สำหรับเครื่องมือที่ห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ เช่น มีดผ่าตัดและปากคีบให้ฉีดพ่นด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ก่อนนำเข้าตู้ แล้วเปิดแสงอุลตราไวโอเลตนาน 15 นาที ก่อนปฏิบัติการ เมื่อปฏิบัติการเสร็จเรียบร้อยแล้ว เช็ดเครื่องมือและอุปกรณ์ในตู้ด้วยผ้าชุบแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์อีกครั้ง

4. วิธีการถ่ายเนื้อเยื่อ

4.1 การทดลองที่ 1 การเพิ่ม protocorm-like body (plbs) ในอาหารสูตรดัดแปลง MS 1/1 MS 1/2 MS 1/3 และ MS 1/4 มีวิธีการตามขั้นตอนดังนี้

4.1.1 นำขวดบรรจุ plbs ของเอื้องกิ่งดำมาฆ่าเชื้อโดยการฉีดพ่นด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์แล้วเช็ดด้วยผ้าสะอาด ก่อนนำเข้าตู้อ่างเนื้อเยื่อที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้วตามข้อ 3.2

4.1.2 ใช้คีบจับกลุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ลนไฟ 2-3 ครั้ง แล้ววางทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปใช้

4.1.3 เปิดปากขวดบรรจุ plbs ของเอื้องกิ่งดำ แล้วนำปากขวดไปลนไฟให้รอบสัก 2 – 3 รอบ

4.1.4 ใช้คีบคีบที่ทำให้ปราศจากเชื้อตามข้อ 4.1.2 คีบ plbs ของเอื้องกิ่งดำ เลือกลงที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 มิลลิเมตร ใส่ลงไปในการอาหารเหลวสูตร MS 1/1 MS 1/2 MS 1/3 และ MS 1/4 สูตรละ 10 ขวดโดยใส่ plbs 1 ของเอื้องกิ่งดำ 1 ชิ้นต่อขวด

4.1.5 นำขวดเพาะเลี้ยงออกจากตู้อ่างเนื้อเยื่อ เขียนชื่อพันธุ์กล้วยไม้ วัน เดือน ปีที่เพาะและสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงลงบนสลาก ติดไว้ข้างขวดเพาะเลี้ยงทุกขวด

4.2 การทดลองที่ 2 การชักนำ plbs ให้เกิดเป็นต้นในอาหารแข็งสูตรดัดแปลง MS 2/1.1 MS 2/1.2 MS 2/1.3 MS 2/1.4 MS 2/2.1 MS 2/2.2 MS 2/2.3 และ MS 2/2.4 มีวิธีการตามขั้นตอนดังนี้

4.2.1 นำขวด plbs ของเอื้องกิ่งดำที่ได้จากการทดลองตอนที่ 1 มาฆ่าเชื้อโดยการพ่นด้วย แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำเข้าตู้อ่างเนื้อเยื่อที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้วตามข้อ 3.2

4.2.2 ใช้คีมีคิปจุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ลนไฟ 2-3 ครั้ง แล้ววางทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปใช้

4.2.3 เปิดปากขวดบรรจุ plbs ของเอื้องกิ่งดำที่ได้จาก 4.2.1 แล้วนำปากขวดไปลนไฟให้รอบ 2-3 รอบ

4.2.4 ใช้คีมีคิปที่ทำให้ปราศจากเชื้อตามข้อ 4.2.2 คีบ plbs ของเอื้องกิ่งดำ โดยเลือกชิ้นที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 มิลลิเมตร ใส่ลงไปในการแช่สูตรดัดแปลงแต่ละสูตร สูตรละ 10 ขวด โดยใส่ plbs ของเอื้องกิ่งดำ 1 ชิ้นต่อขวด แล้วนำปากขวดไปลนไฟให้รอบ 2 – 3 รอบ ก่อนปิดฝาขวดให้แน่น

4.2.5 นำขวดเพาะเลี้ยงออกจากตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ เขียนชื่อพันธุ์กล้วยไม้ วัน เดือน ปีที่เพาะ และสูตรอาหารที่เพาะเลี้ยงลงบนสลาก ติดไว้ข้างขวดเพาะเลี้ยงทุกขวด

5. สภาพการเพาะเลี้ยง

5.1 การทดลองที่ 1 เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ภายในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้ได้รับแสงสีขาวจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ นาน 12 ชั่วโมงต่อวัน

5.2 การทดลองที่ 2 เพาะเลี้ยงบนชั้นภายในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้ได้รับแสงสีขาวจากหลอดฟลูออเรสเซนต์นาน 12 ชั่วโมงต่อวัน

6. วิธีวิจัย

การทดลองแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน

การทดลองตอนที่ 1 ศึกษาเปรียบเทียบการเพิ่มปริมาณของ plbs ของเอื้องกิ่งดำในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง MS 4 สูตร (MS 1/1 MS 1/2 MS 1/3 และ MS 1/4)

ทดลองโดยวิธีเพาะเลี้ยง plbs ของเอื้องกิ่งดำที่ได้จากการเพาะเมล็ดลงในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง MS ตามวิธีการในข้อ 4.1 (ข้อ 4.1.1-4.1.5) โดยสภาพการเพาะเลี้ยงเป็นไปตามข้อ 5.1 และถ่ายขวดเปลี่ยนอาหาร (sub culture) ทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

การบันทึกผล บันทึกจำนวนและน้ำหนักของ plbs ทุก 2 สัปดาห์เป็นเวลา 8 สัปดาห์

การทดลองตอนที่ 2 ศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ plbs ของเอื้องกิ่งดำในอาหารแข็งสูตรดัดแปลง MS ซึ่งดัดแปลงโดยใส่วุ้น 7.8 กรัมต่อลิตร ผงถ่าน 0.5 กรัมต่อลิตร ใส่น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร ใส่น้ำสกัดมันฝรั่งแตกต่างกันเป็น 2 ระดับ (100 และ 200 กรัมต่อลิตร) และใส่น้ำตาลทรายขาวแตกต่างกันเป็น 4 ระดับ (0 , 10 ,20 และ 30 กรัมต่อลิตร)

ทดลองโดยนำ plbs ที่ได้จากการทดลองตอนที่ 1 ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS 1/1 (เป็นสูตรอาหารเหลวที่ plbs เจริญได้ดีที่สุด) เพาะเลี้ยงลงในอาหารแข็งสูตรดัดแปลง MS ตามวิธีการในข้อ 4.2 (ข้อ 4.2.1 – 4.2.5) โดยสภาพการเพาะเลี้ยงเป็นไปตามข้อ 5.2 และถ่ายขวดเปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์เป็นเวลา 20 สัปดาห์

การบันทึกผล บันทึกจำนวนยอด (shoot primordia) และจำนวนรากที่เกิดจาก plbs ทุก 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 20 สัปดาห์

7. การวิเคราะห์ผลการทดลอง

การทดลองตอนที่ 1 วิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one – way analysis of variance) ของน้ำหนักและจำนวน plbs ของกล้วยไม้พันธุ์เอื้องกิ่งดำที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง MS 1/1 MS 1/2 MS 1/3 และ MS 1/4 ทุก 2 สัปดาห์ โดยใช้โปรแกรม SPSS และวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ระหว่างจำนวน plbs กับปริมาณน้ำตาล และระหว่างน้ำหนัก plbs กับปริมาณน้ำตาล

การทดลองตอนที่ 2 วิเคราะห์ความแปรปรวนสองทาง (two – way analysis of variance) ของจำนวนยอดและจำนวนรากกับปริมาณของน้ำสกัดมันฝรั่ง 2 ระดับ (100 และ 200 กรัมต่อลิตร) และกับปริมาณน้ำตาล 4 ระดับ (0 , 10 , 20 และ 30 กรัมต่อลิตร)