หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

การทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน้าวัว เริ่มตั้งแต่วันที่ 12 มีนาคม พ.ศ. 2520 ถึงวันที่ 3 มีนาคม พ.ศ. 2523 ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และโรงเรือนปลูกหน้าวัว ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีอุปกรณ์และวิธีดำเนินการดังนี้

<u>อุปกรณ์</u>

1. พืชทดลองได้แก่ หน้าวัวพันธุ์ต่าง ๆ

1.1 ต้นพันธุ์จากฮาวายได้แก่ Marian seefurth, Kaumana Nitta, Hawaii Orange-139 ต้นพันธุ์ที่ปลูกอยู่ในประเทศไทย ได้แก่ ดวงสมร ผกามาศ จักรพรรดิ์ ดาราทอง และพันธุ์ที่ยังไม่มีชื่อ คือ ต้น T_3, T_4, T_7, T_{22}, T_{57}, n_2, n_6, n_{68}, a_2

1.2 ผลหน้าวัวที่เกิดจากต้นพันธุ์ดวงสมร ซึ่งติดเองตามธรรมชาติจากสถานีทดลองพืชสวน อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ และผลหน้าวัวที่เกิดจากต้นพันธุ์ n_7 ซึ่งติดเองโดยธรรมชาติ จากโรงเรือนปลูกหน้าวัว ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 ต้นอ่อนพันธุ์ฮาวาย (H_{18}) และพันธุ์ไทย (n_7) ที่เลี้ยงในหลอดทดลอง

2. เครื่องแก้วต่าง ๆ ได้แก่ ขวดคอแคบ ฟลาสก์ ปิเปตต์ บิกเกอร์ จานเพาะเชื้อ (petridish) กระบอกตวง แท่งแก้วคน

3. สารเคมีต่าง ๆ

3.1 สารเคมีที่ใช้ฆ่าเชื้อ ได้แก่ คลอร็อกซ์ เอทธิลแอลกอฮอล

3.2 สารเคมีที่ควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ 2, 4-D (2, 4-D-dichlorophenoxy acetic acid), NAA (Naphthalene acetic acid), BAP (6-benzylamino purine) และ Kinetin (6-Furfurylamino purine)

3.3 วุ้น (Agar)

3.4 น้ำตาล กลูโคส และซูโครส

3.5 สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

4. เครื่องมือผ่าตัด ได้แก่ มีดผ่าตัด และปากคีบ

5. เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง เครื่องวัดแสง เครื่องชั่ง ตะเกียงแอลกอฮอล หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ เครื่องอุลตราโซนิค

6. ตู้ถ่ายเชื้อขนาด 1 x 0.5 x 0.5 เมตร ซึ่งติดหลอดอุลตราไวโอเลต และหลอดไฟธรรมดา อยู่ภายใน

7. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ควบคุมอุณหภูมิที่ 26 $\pm$ 1 °ซ. ความชื้นสัมพัทธ์ 34.5% มีชั้นวางขวดที่มีแสงจากหลอดไฟ Super grow ให้ความเข้ม 2,000 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมง และชั้นวางขวดที่คลุมด้วยผ้าสีดำอยู่ในสภาพมืดตลอด 24 ชั่วโมง

8. เครื่องเขย่า ความเร็ว 120 รอบต่อนาที

9. กระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 นิ้ว และอิฐมอญทุบละเอียด หรือเวอมิคูไลท์

10. กล้องถ่ายภาพ กล้องจุลทัศน์ 3 มิติ

ตารางที่ 1 แสดงองค์ประกอบของอาหารสูตรต่าง ๆ กัน

Constituents	concentration in medium (mg/lit)			
	MS (1962)	PCI (1976)	PCSS (1976)	PCSL (1976)
Macronutrient				
Ammonium nitrate (NH_4NO_3)	1650	825	825	1650
Potassium nitrate (KNO_3)	1900	950	950	1900
Monopotassium acid phosphate (KH_2PO_4)	170	85	85	170
Calcium chloride ($CaCl_2$)	440	440	220	440
Magnesium sulphate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	440	370	185	440
Micronutrient				
Boric acid (H_3BO_3)	6.200	6.200	6.200	6.200
Manganese sulphate ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)	6.900	6.900	6.900	6.900
Zinc sulphate ($ZnSO_4 \cdot 4H_2O$)	6.140	6.140	6.140	6.140
Potassium iodide (KI)	0.830	0.830	0.830	0.830
Sodium molybdate ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0.025	0.025	0.025	0.025
Copper sulphate ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.025	0.025	0.025	0.025
Cobalt chloride ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	0.025	0.025	0.025	0.025

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Constituents	concentration in medium (mg/lit)			
	MS (1962)	PCI (1976)	PCSS (1976)	PCSL (1976)
Iron				
Disodium ethylene diamine tetra acetic acid ($C_{10}N_{14}N_2O_8Na_2.2H_2O$)	37.25	23.45	23.45	23.45
Ferrous sulphate ($FeSO_4.7H_2O$)	27.85	17.55	17.55	17.55
Organic Component				
Inositol	100	100	100	100
Glycine	2	2	2	2
Nicotinic acid	0.50	0.50	0.50	0.50
Pyridoxine (B_6)	0.50	0.50	0.50	0.50
Thiamine (B_1)	0.10	0.10	0.10	0.10
Sucrose	30,000	-	-	-
Glucose	-	30,000	20,000	20,000
pH	5.6	6	6	6
Agar	700	700	700	-

MS = Modified Murashige and Skoog (12)

PCI = Pierik callus induction (11)

PCSS = Pierik callus subculture solid media (11)

PCSL = Pierik callus subculture liquid media (11)

วิธีทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงเมล็ด (Seed culture)

1.1 การชักนำให้เกิดแคลลัส

นำผลหน้าวัวจากฝาง ซึ่งมีลักษณะค่อนข้างเละเนื่องจากการขนส่ง มาล้างเนื้อทิ้งเหลือแต่เมล็ดล้างให้สะอาด นำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วย คลอร็อกซ์ 10% เป็นเวลา 15 นาที แล้วฟอกด้วย คลอร็อกซ์ 5% เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ส่วนผลหน้าวัวจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นำมาล้างให้สะอาดนำมาฟอกฆ่าเชื้อ โดยชุบแอลกอฮอล 95% แล้วลนไฟ ใช้ปากคีบรูดเนื้อออก นำเมล็ดทั้งหมดมาเพาะในตู้ถ่ายเชื้อบนอาหารสูตร PCI ที่เติม 2, 4-D 0.08 ppm Kinetin 1 ppm (PCI 0.08D 1K) ทำการทดลอง 19 ขวด โดยเลี้ยง 1 เมล็ดต่อ 1 ขวด เป็นเมล็ดหน้าวัวจากฝาง 14 เมล็ด เมล็ดจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 5 เมล็ด นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงบนชั้นที่มืด เปลี่ยนอาหารทุก 1 – 2 เดือน จนเกิดแคลลัส เก็บผลโดยการสังเกตและบันทึกภาพ

1.2 การเพิ่มปริมาณแคลลัส

1.2.1 อิทธิพลของสภาพอาหาร แสงและความเข้มข้นของ BAP

นำแคลลัสที่เกิดจากเมล็ดจากข้อ 1.1 มาเปลี่ยนอาหารใหม่ในตู้ถ่ายเชื้อ โดยใส่ในอาหารเหลวสูตร PCSL เติม BAP 1 ppm เข้าเครื่องเขย่า ที่อยู่ในห้องเพาะเลี้ยง ได้รับแสงจากฟลูออเรสเซนต์ความเข้มประมาณ 900 ลักซ์ เปลี่ยนอาหารทุก 1 – 2 เดือน เป็นเวลา 4 เดือน จึงนำแคลลัสมาทดลองต่อไป

นำแคลลัสที่เกิดจากเมล็ดที่ฝาง มาถ่ายอาหารในตู้ถ่ายเชื้อ โดยใส่ในอาหาร 2 ชนิด คือ อาหารเหลวและอาหารแข็งประกอบด้วยวุ้น 0.7% โดยใช้สูตรอาหารเดียวกัน คือ สูตรอาหาร PCSL ที่เติม BAP 0, 1, 2, 3 ppm นำมาเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยง โดยวางอาหารเหลวไว้บนเครื่องเขย่า พวกหนึ่งได้รับแสง อีกพวกหนึ่งอยู่

ในที่มืดซึ่งใช้ผ้าคลุม ส่วนอาหารแข็งพวกหนึ่งอยู่บนชั้นที่มีแสง อีกพวกหนึ่งอยู่บนชั้นที่มืด ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เลี้ยงไว้เป็นเวลา 1 เดือน นำมาหาน้ำหนักของแคลลัสครั้งแรก พร้อมกับเปลี่ยนอาหาร นำไปเลี้ยงในสภาพเดิมเป็นเวลา 1 เดือน นำมาหาน้ำหนักโดยวิธีเดียวกัน นำน้ำหนักแคลลัสทั้ง 2 มาหาน้ำหนักเฉลี่ย และหาเปอร์เซนต์การเจริญเติบโตจากสูตร

$$\text{เปอร์เซนต์การเจริญเติบโต} = \frac{(\text{น้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสอายุ 2 เดือน} - \text{น้ำหนักของแคลลัสอายุ 1 เดือน}) \times 100}{\text{น้ำหนักเฉลี่ยแคลลัสอายุ 1 เดือน}}$$

เก็บผลโดยการหาเปอร์เซนต์การเจริญเติบโต

1.2.2 อิทธิพลของน้ำตาล

นำแคลลัสจากอาหารสูตร PCSL ที่ไม่มี BA และเลี้ยงในที่มืด มาทำการทดลองต่อ โดยถ่ายใส่อาหารสูตร PCSL + BAP 1 ppm และเติมกลูโคส 2% (PCSL-G) หรือ ซูโครส 2% (PCSL-S) เลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าในที่มืด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เป็นเวลา 1 เดือน นำมาหาน้ำหนักโดยวิธีเดียวกับครั้งแรก พร้อมกับเปลี่ยนอาหารใหม่ เลี้ยงไว้ในสภาพเดิมเป็นเวลาอีก 1 เดือน นำมาหาน้ำหนัก พร้อมกับหาเปอร์เซนต์การเจริญเติบโต

1.3 การเกิดต้นและราก

นำแคลลัสที่เกิดจากเมล็ดมาเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง MS + NAA 1 ppm + Kinetin 1 ppm (MS-1N1K) นำมาไว้ในห้องเพาะเลี้ยงบนชั้นที่มีแสง เปลี่ยนอาหารทุก 1 – 2 เดือน เก็บผลโดยการสังเกตและบันทึกภาพ

2. การเพาะเลี้ยงอวัยวะส่วนต่าง ๆ จากต้นอ่อน

(Organ culture from seedling)

นำต้นอ่อนที่เลี้ยงในหลอดทดลองพันธุ์ฮาวาย (H_{18}) และพันธุ์ไทย (n_7) มาตัดเอาอวัยวะส่วนต่าง ๆ คือ ใบ ก้านใบ ข้อ และปลายราก มาเลี้ยงในสูตรอาหารต่าง ๆ ดังนี้

MS

MS + 2, 4-D 1 ppm + Kinetin 1 ppm (MS-1D1K)

MS + NAA 1 ppm + Kinetin 1 ppm (MS-1N1K)

นำไปไว้ในห้องเพาะเลี้ยง บนชั้นที่มีแสง ทำการทดลอง 10 ซ้ำ เปลี่ยนอาหารทุก 1 – 2 เดือน ทำการทดลอง 7 เดือน เก็บผลโดยการสังเกตและบันทึกภาพ

3. การเพาะเลี้ยงอวัยวะส่วนต่าง ๆ จากต้นที่ปลูกในกระถาง

(Organ culture from potted anthurium)

3.1 การศึกษาหาอวัยวะที่ปลอดเชื้อ

นำหน้าวัวพันธุ์ควงสมร ที่ปลูกในกระถางมาทั้งต้น ล้างน้ำให้สะอาด ตัดใบอ่อน ก้านใบอ่อน จานรองดอกอ่อน ก้านช่อดอกอ่อน ช่อดอกอ่อน ข้อและปลายราก แยกไว้ในภาชนะที่สะอาด นำแต่ละส่วนมาล้างน้ำฟอกสบู่ให้สะอาด เช็ดด้วยเอทธิลแอลกอฮอล 70% แล้วฟอกด้วยคลอร็อกซ์ 10% นาน 15 นาที ตามด้วยคลอร็อกซ์ 5% นาน 5 นาที นำเข้าเครื่องอุลตราโซนิค 5 – 7 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ตัดอวัยวะต่าง ๆ ในตู้ถ่ายเชื้อโดยวิธีการดังนี้

ใบอ่อน และจานรองดอกอ่อน ตัดเป็นแผ่นเล็ก ๆ ขนาด 0.5 x 0.5 ซม. วางบนอาหาร MS ในแนวราบ

ก้านใบอ่อน ก้านช่อดอกอ่อน และช่อดอกอ่อน ตัดเป็นท่อน ๆ ยาวประมาณ 0.5 ซม. วางบนอาหาร MS ในแนวนอน

ข้อ ลอกเอาส่วนที่เป็นสีน้ำตาลออก ตัดเอาเฉพาะตาขนาด 0.2 x 0.2 ซม. นำมาวางบนอาหาร MS ในแนวตั้ง

ปลายราก ตัดบริเวณโคนรากทิ้ง ให้เหลือปลายราก ยาวประมาณ 0.5 ซม. วางบนอาหาร MS ในแนวนอน

นำอวัยวะทั้งหมดมาไว้ในห้องเพาะเลี้ยง โดยวางบนชั้นที่มืดเป็นเวลานาน 1 – 2 สัปดาห์ เก็บผลการทดลองโดยหาเปอร์เซนต์ปลอดเชื้อ

3.2 ความสามารถในการเกิดแคลลัสจากอวัยวะต่าง ๆ

นำเอาเนื้อเยื่อของอวัยวะต่าง ๆ ที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อจากการทดลองที่ 3.1 มาถ่ายในตู้ถ่ายเชื้อใส่อาหารสูตร MS-1N1K และอาหารสูตร MS-1D1B นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงโดยอวัยวะที่อยู่ในอาหารสูตร MS-1N1K ไว้บนชั้นที่มีแสงและอาหารสูตร MS-1D1B ไว้บนชั้นที่มืด ทำการทดลอง 8 ซ้ำ เปลี่ยนอาหารทุก 1 – 2 เดือน เก็บผลโดยการสังเกตและบันทึกภาพ เมื่ออายุ 3 เดือน

3.3 การศึกษาหาสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบอ่อน

ใช้การทดลองเดียวกับข้อ 3.2

3.4 ความสามารถในการสร้างแคลลัสจากใบอ่อนหน่าวัวพันธุ์ต่าง ๆ

นำใบอ่อนหน่าวัวพันธุ์ต่าง ๆ ล้างน้ำฟอกสบู่ เช็ดด้วยแอลกอฮอล 70% แล้วนำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วย คอลร็อกซ์ 10% เป็นเวลา 15 นาที แล้วตามด้วย คลอร็อกซ์ 5% เป็นเวลา 5 นาที นำไปเข้าเครื่องอุลตราโซนิค 5 – 7 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำไปตัดในตู้ถ่ายเชื้อเป็นชิ้นขนาด 0.5 x 0.5 ซม. และวางบนอาหารสูตร MS-1D1B ในแนวนอน และนำไปไว้ในห้องเพาะเลี้ยงบนชั้นที่มืด ทำการทดลอง 5 ซ้ำ ถ่ายอาหารทุก 1 – 2 เดือน เป็นเวลา 3 เดือน เก็บผลโดยการ

หาเปอร์เซนต์ การเกิดแคลลัสต่อจำนวนชิ้นใบอ่อน และสังเกตการเจริญเติบโตของแคลลัส

3.5 ศึกษาอิทธิพลของ 2, 4-D และ BAP ในการเกิดแคลลัส

3.5.1 อาหารสูตร MS

นำใบอ่อนหน้าวัวพันธุ์ดวงสมรที่ทำให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อตามวิธีการในข้อ 3.1 มาถ่ายในตู้ถ่ายเชื้อ ใส่ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 0, 0.08, 0.5, 1 ppm และ/หรือ BAP ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4 ppm นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงบนชั้นที่มืด ทำการทดลอง 8 ซ้ำ เปลี่ยนอาหารทุก 1 – 2 เดือน ทำการทดลองเป็นเวลา 3 เดือน 2 สัปดาห์ เก็บผลโดยการสังเกตและบันทึกภาพ

3.5.2 อาหารสูตร PCI

นำใบอ่อนหน้าวัวพันธุ์ดวงสมร ที่ทำให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อตามวิธีการในข้อ 3.1 มาถ่ายใส่ในอาหารสูตร PCI ที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 0, 0.8, 0.5, 1 ppm และ/หรือ BAP ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4 ppm นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยง บนชั้นที่มืด ทำการทดลอง 6 ซ้ำ เปลี่ยนอาหารทุก 1 – 2 เดือน ทำการทดลองเป็นเวลา 3 เดือน 2 สัปดาห์ เก็บผลโดยการสังเกตและบันทึกภาพ

3.6 ศึกษาอิทธิพลของ BAP และชนิดของน้ำตาล ในการเพิ่มปริมาณแคลลัส

นำแคลลัสที่เกิดจากใบอ่อนหน้าวัวพันธุ์ผกามาศ ซึ่งเลี้ยงในสูตรอาหาร MS-1D1B มาถ่ายลงในอาหารสูตร PCSS ใส่น้ำตาลกลูโคสหรือซูโครส 2% เติม BAP ความเข้มข้น 0, 1, 2, 4 ppm นำไปเลี้ยงบนชั้นที่มืด ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ถ่ายอาหารทุก 1 – 2 เดือน เป็นเวลา 3 เดือน 2 สัปดาห์ เก็บผลโดยการสังเกตและบันทึกภาพ

3.7 ความสามารถในการเพิ่มปริมาณแคลลัสของหน้าวัวพันธุ์ต่าง ๆ

3.7.1 สูตร MS-1D1B

นำแคลลัสที่เกิดจากใบอ่อนหน้าวัวพันธุ์ต่าง ๆ จากอาหารสูตร MS-1D1B ถ่ายลงบนอาหารสูตรเดิมในตู้ถ่ายเชื้อ และนำไปไว้ในสภาพเดิมเช่นเดียวกับข้อ 3.4 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เก็บผลโดยการสังเกตและบันทึกภาพ

3.7.2 สูตร MS-1.5D 2B

นำแคลลัสที่เกิดจากใบอ่อนหน้าวัวพันธุ์ต่าง ๆ จากอาหารสูตร MS-1D1B ถ่ายใส่อาหารสูตร MS-1.5D 2B ในตู้ถ่ายเชื้อ นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงบนชั้นที่มืด เปลี่ยนอาหารทุก 1 – 2 เดือน ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ เป็นเวลา 3 เดือน เก็บผลโดยการสังเกตและบันทึกภาพ

3.7.3 สูตร PCSS + ซูโครส 2% + BAP 2 ppm ($PCSS-S_2$)

นำใบอ่อนที่เกิดแคลลัสพันธุ์ต่าง ๆ จากอาหารสูตร MS-1D1B ถ่ายใส่อาหารสูตร $PCSS-S_2$ ในตู้ถ่ายเชื้อ นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงบนชั้นที่มืด เปลี่ยนอาหารทุก 1 – 2 เดือน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เป็นเวลา 4 เดือน เก็บผลโดยการสังเกตและบันทึกภาพ

3.8 อิทธิพลของ BAP และชนิดของน้ำตาลในการเกิดต้นและราก

ทำการทดลองต่อเนื่องจากข้อ 3.6

3.9 ความสามารถในการเกิดต้นและรากของหน้าวัวพันธุ์ต่าง ๆ

3.9.1 สูตร MS-1D1B

เป็นการทดลองต่อเนื่องจากข้อ 3.7.1

3.9.2 สูตร MS-1.5D 2B

เป็นการทดลองต่อเนื่องจากข้อ 3.7.2

3.9.3 สูตร MS-1.5D 2B + แสง

นำแคลลัสที่เกิดจากใบอ่อนพันธุ์ $ล_2$ ซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตร MS-1.5D 2B เป็นเวลา 3 เดือน ในที่มืด มาไว้บนชั้นที่มีแสง 2,000 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมง ในห้องเพาะเลี้ยง ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เป็นเวลานาน 4 เดือน เก็บผลโดยการสังเกตและบันทึกภาพ

3.9.4 สูตร MS-1N1K

นำแคลลัสที่เกิดจากใบอ่อนพันธุ์ต่าง ๆ ซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตร MS-1D1B มาถ่ายใส่อาหารสูตร MS-1N1K ในตู้ถ่ายเชื้อ นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยง บนชั้นที่มีแสง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เป็นเวลา 4 เดือน เก็บผลโดยการสังเกตและบันทึกภาพ

3.9.5 สูตร PCSS-S_2

เป็นการทดลองต่อเนื่องจากข้อ 3.7.3

3.10 การสร้างคลอโรฟิล

นำต้นอ่อนที่เกิดจากพันธุ์ต่าง ๆ ซึ่งอยู่ในที่มืด วางบนชั้นที่มีแสงในห้องเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 4 เดือน เก็บผลโดยการสังเกตและบันทึกภาพ

4. การย้ายมาปลูกในกระถาง (Transplanting)

นำต้นอ่อนที่มีรากสมบูรณ์จากการทดลองที่ 1, 2, 3 มาล้างด้วยน้ำผสมยาฆ่าเชื้อรา (Orthocide) เขย่าให้วุ้นหลุดออกให้หมด นำมาปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 นิ้ว โดยใช้อิฐมอญทุบเป็นก้อนเล็ก ๆ หรือเวอร์มิคูไลท์เป็นเครื่องปลูก รดน้ำให้ชุ่ม หุ้มปากกระถางด้วยถุงพลาสติกวางไว้บนจานรองมีน้ำหล่อรอจนต้นออนตั้งตัวได้จึงนำถุงพลาสติกออก เก็บผลโดยการสังเกตและบันทึกภาพ

000503