บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 ยอดไฮเดรนเยียที่ได้จากการขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ

1.2 เครื่องชั่งชนิดละเอียด (analytical balance)

1.3 เครื่องชั่งไฟฟ้า (electrical balance)

1.4 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง

1.5 หม้อนึ่งความดันไอ

1.6 กล้องจุลทรรศน์ (dissecting microscope)

1.7 เตาไฟฟ้า

1.8 เตาแก๊ส

1.9 ตู้กรองอากาศ (air flow cabinet)

1.10 ตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่สามารถควบคุมอุณหภูมิและแสง

1.11 ชั้นสำหรับวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.12 ขวดรูปชมพู่ (erlenmyer flask) ขนาด 125 มล

1.13 หลอดทดลองขนาด 25 x 150 มม

1.14 ปิเปต

1.15 ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 1000 มล

1.16 บีกเกอร์

1.17 กระบอกตวง

1.18 ขวดใส่สารละลายเข้มข้น

1.19 จานเลี้ยงเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.20 ช้อนตักสาร

1.21 วัสดุที่ใช้ในตู้กรองอากาศ

1.21.1 ด้ามมีดและใบมีดผ่าตัดเบอร์ 10 หรือเบอร์ 11

1.21.2 ใบมีดโกนที่ตัดเป็นใบมีดเล็กขนาด 2 x 10 มม

1.21.3 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 3

1.21.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.21.5 ปากคีบขนาดยาว 140 และ 180 ซม

1.21.6 หลอดทดลองใส่แอลกอฮอล์

1.21.7 แผ่นพลาสติกขนาด 70 x 90 มม

1.22 วัสดุอื่น ๆ เช่น ยางรัดของ กระดาษอลูมินัม (aluminum foil) ฯลฯ

1.23 น้ำกลั่นซึ่งกลั่นจากเครื่องแก้ว

1.24 วัสดุที่ใช้ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

1.24.1 สไลด์และกระจกปิดสไลด์

1.24.2 ขวดเล็ก (vial)

1.24.3 ขวดแก้วย้อมสี (coplin jar)

1.24.4 ตู้อบ

1.24.5 เครื่องอุ่นแผ่นสไลด์

1.24.6 แท่งไม้

1.24.7 เครื่องฝานเนื้อเยื่อ (microtome)

1.24.8 วัสดุอื่น ๆ เช่น เข็มเขี่ย ปากคีบ พู่กัน ฯลฯ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับการฆ่าเชื้อ

2.1.1 Clorox ของบริษัท The Clorox Co., Oakland U.S.A.

2.1.2 Tween 20

2.2 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหาร

2.2.1 เกลือให้ธาตุอาหารหลักต่าง ๆ ตามสูตร MS(1962)

2.2.2 เกลือให้ธาตุอาหารรองต่าง ๆ ตามสูตร MS(1962)

2.2.3 วิตามินต่าง ๆ ตามสูตร MS(1962)

2.2.4 Ferrous sulfate ของบริษัท J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg N.J., U.S.A.

2.2.5 Ethylene diamine tetra acetic acid diNa-salt dihydrate ของบริษัท Koch-Light Laboratories Ltd., England

2.2.6 สารควบคุมการเจริญของพืช

2.2.6.1 Indole butyric acid (IBA) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt West Germany

2.2.6.2 Benzyl amino purine (BAP)

2.2.6.3 Gibberellic acid (GA_3)

2.2.6.4 Naphthalene acetic acid (NAA)

2.2.6.5 6-Furfuryl aminopurine (kinetin)

รายการที่ 2.2.6.2-2.2.6.5 ของบริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.

2.2.7 Potassium iodide 1 N

2.2.8 Hydrochloric acid 1 N

2.2.9 น้ำกลั่น

2.2.10 ผงวุ้น (agar) ตราเฮลิคอปเตอร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3 สารที่ใช้ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

2.3.1 Xylol ของบริษัท Riedel-de Haen AG Seelze-Hannover, West Germany

2.3.2 สี Haematoxylin

2.3.3 Glacial acetic acid

2.3.4 Formalin

2.3.5 Paraffin oil

2.3.6 Paraffin

2.3.7 Tertiary butyl alcohol (TBA)

2.3.8 Canada balsam

2.3.9 Ethanol ความเข้มข้น 70 และ 95%

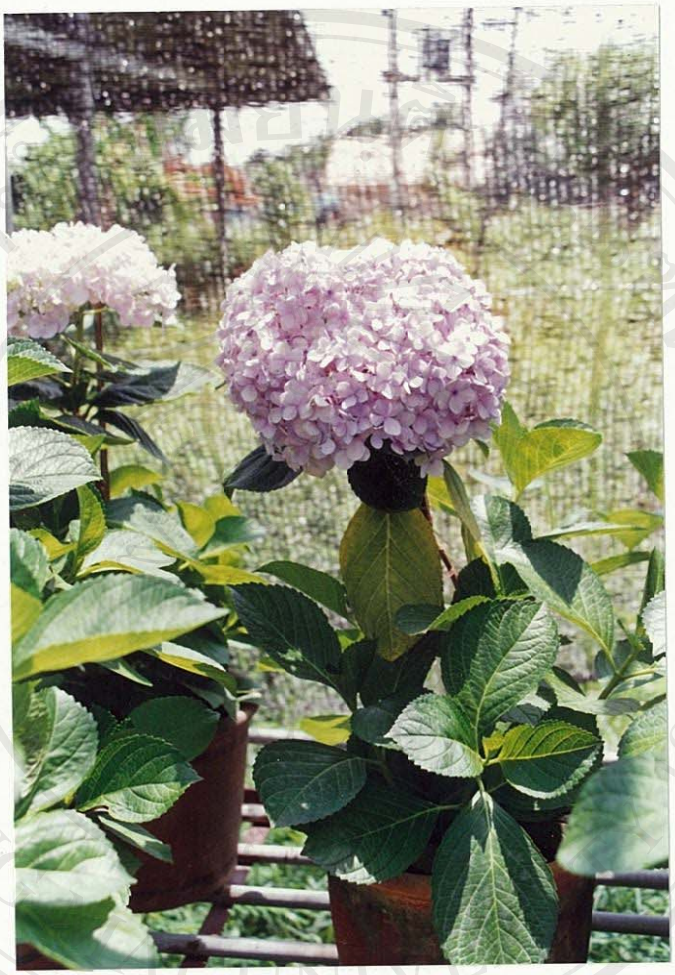
2.3.10 Absolute ethyl alcohol

2.3.11 Ether

3. การเตรียมต้นพืชทดลอง

ชิ้นส่วนพืชทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้มาจากการขยายพันธุ์เริ่มแรกจากส่วนยอดของไฮเดรนเยีย ซึ่งปลูกเลี้ยงในเรือนเพาะชำ หมวดวิชาไม้ดอกไม้ประดับ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (ภาพที่ 1 หน้า 28) โดยคัดเลือกจากกิ่งสมบูรณ์ที่อยู่ส่วนบนของลำต้น (ภาพที่ 2 หน้า 29) ตัดกิ่งพันธุ์ที่คัดเลือกให้มีใบที่คลี่แล้วติดมา 2 คู่ ตัดใบที่คลี่ออกพร้อมกับตัดแต่งให้แต่ละยอดมีขนาด 1.5 ซม (ภาพที่ 3 ก. หน้า 30) ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวของยอดพันธุ์ โดยการนำมาแช่ย่าในสารละลายคลอร๊อกซ์ที่มีความเข้มข้น 10% ซึ่งเตรียมโดยใช้สารละลายคลอร๊อกซ์ 10 มล ผสมน้ำกลั่น 90 มล + Tween 20 ความเข้มข้น 0.1% แช่ย่ายอดพันธุ์ดังกล่าวในสารละลายคลอร๊อกซ์เป็นเวลานาน 15 นาที (ภาพที่ 3 ข.หน้า 30) หลังจากนั้นจึงนำยอดพันธุ์มาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง โดยทำในตู้ปลอดเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 1 ไฮเดรนเยีย (Hydrangea macrophylla Thunb.) ที่ปลูกในเรือนเพาะชำ หมวดวิชาไม้ดอกไม้ประดับ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 2 ตำแหน่งของยอดพันธุ์ไฮเดรนเยียที่นำมาเลี้ยง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

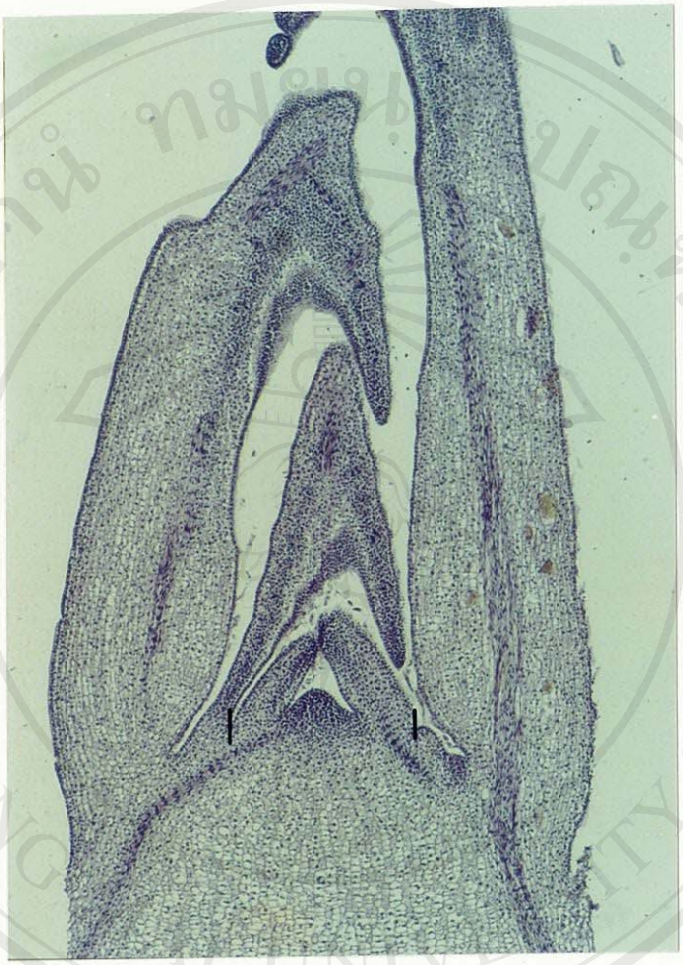
ภาพที่ 3 การเตรียมชิ้นส่วนทดลองเริ่มต้น

ก. การตัดแต่งยอดพันธุ์ไฮเดรนเยียก่อนการฆ่าเชื้อ

ข. การฆ่าเชื้อยอดพันธุ์ในสารละลายคลอร๊อกซ + Tween 20

นำปลายยอดไฮเดรนเยียที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว มาตัดใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งตั้งอยู่ในตู้ปลอดเชื้อ โดยตัดใบออก เริ่มแรกจะใช้กำลังขยาย 12.5 X (เท่า) จากนั้นจึงเพิ่มกำลังขยายขึ้นเป็น 25 หรือ 50 X ตามความเหมาะสม ตัดใบอ่อนออก 2-3 คู่ จนได้ส่วนของปลายยอด (shoot tip) ขนาด 0.1 มม ซึ่งประกอบด้วยหน่วยเติบโตของยอดและใบอ่อนมาก (leaf primordia) 1 คู่ (ภาพที่ 4, 5 หน้า 31,32) แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี IBA และ BAP 0.5 และ 2.25 มก/ล ตามลำดับ และน้ำมะพร้าว 10% ในหลอดทดลอง (ส่วนประกอบของอาหารดูตารางที่ 1-5 หน้า 33-38)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4 ภาพตัดตามยาวของปลายยอดไฮเดรนเยีย (145 X)

| | คือส่วนที่ใช้ในการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 5 ภาพตัดตามขวางของปลายยอดไฮเดรนเยีย (215X)

| | คือส่วนที่ใช้ในการทดลอง

นำไปเก็บไว้ในสภาพการเลี้ยงเริ่มแรกที่อุณหภูมิ 28 ± 2 °ซ ความเข้มแสงประมาณ 2,000 ลักซ์ 24 ชม/วัน หลังจากนั้นเมื่อเลี้ยงปลายยอดเป็นเวลา 2 เดือน จะได้ต้นซึ่งมีความสูงประมาณ 1.8 ซม มีใบ 7 คู่ ทำการตัดโดยตัดส่วนยอดและตัดแต่ละข้อซึ่งมีใบ 1 คู่ แล้วนำส่วนยอดและข้อเลี้ยงแยกกัน บนอาหารสูตรเดิม ในขวดปากกว้างขนาด 75 x 120 มม โดยเลี้ยง 20 ชิ้น/ขวด และจะทำการตัดทุก ๆ เดือน เพื่อเพิ่มปริมาณ นำขวดไปวางไว้บนชั้นสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 85 x 125 ซม ซึ่งติดหลอดฟลูออเรสเซนต์ขนาดกำลัง 40 วัตต์ (Watt) ชั้นละ 3 หลอด ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ระยะเวลาให้แสง 16 ชม/วัน อุณหภูมิ 28 ± 2 °ซ

ยอดที่ได้จากการเลี้ยงเหล่านี้นำไปใช้ในการทดลองต่าง ๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution)

4.1 การเตรียมธาตุอาหารหลัก

เตรียมธาตุอาหารหลักที่ใช้ในสูตร MS(1962) ซึ่งจะเตรียมแยกเป็นขวดละชนิด โดยให้แต่ละชนิดมีความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตรชนิดละ 200 มล โดยใช้ปริมาณสารดังต่อไปนี้

ตารางที่ 1 ชนิดและปริมาณของสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร MS(1962)

ชนิดของสาร	ปริมาณสารในสูตร MS(1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยา 200 มล (ก)
NH_4NO_3	1,650	16.008
KNO_3	1,900	20.220
$CaCl_2.2H_2O$	440	29.404
$MgSO_4.7H_2O$	370	49.296
KH_2PO_4	170	27.218

4.2 การเตรียมธาตุอาหารรอง

เตรียมธาตุอาหารรองโดยใช้สูตร MS(1962) โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน ความเข้มข้นของสารมากกว่าที่ใช้จริง 100 X ชั่งสารแต่ละชนิดตามที่กำหนด (ตารางที่ 2 หน้า 34) ละลายน้ำกลั่น รวมกันให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 ชนิดและปริมาณของสาร ในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรองสูตร MS(1962) ความเข้มข้น 100 X

ชนิดของสาร	ปริมาณสารในสูตร MS(1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาเข้มข้นปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล (มก)
$CuSO_4 . 5H_2O$	0.025	2.5
KI	0.83	83
$ZnSO_4 . 7H_2O$	8.60	860
$MnSO_4 . 4H_2O$	22.30	2,230
H_3BO_3	6.2	620
$Na_2MoO_4 . 2H_2O$	0.25	25
$CoCl_2 . 6H_2O$	0.025	2.5

4.3 การเตรียมวิตามิน

เตรียมวิตามินสูตร MS(1962) โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมกันไว้ในขวดให้มีความเข้มข้นมากกว่าที่ใช้จริง 100 X ชั่งสารแต่ละชนิดตามที่กำหนด (ตารางที่ 3 หน้า 35) ละลายน้ำกลั่นรวมกันให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3 ชนิดและปริมาณของสารในสารละลายเข้มข้นของวิตามินสูตร MS(1962) ความเข้มข้น 100 X

ชนิดของสาร	ปริมาณสารในสูตร MS(1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาเข้มข้นปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล (ก)
glycine	2	0.2
myo-inositol	100	10.0
thiamine.HCl	0.1	0.01
pyridoxine	0.5	0.05
nicotinic acid	0.5	0.05

4.4 การเตรียมสารละลายเหล็กในรูป FeEDTA

เตรียม FeEDTA ตามสูตร MS(1962) ซึ่งประกอบด้วย $Na_2EDTA.2H_2O$ และ $FeSO_4.7H_2O$ โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน โดยมีความเข้มข้นมากกว่าที่ใช้จริง 100 X ชั่งสารแต่ละชนิดดังกล่าวตามที่กำหนด (ตารางที่ 4 หน้า 36) ละลายสารแต่ละส่วนในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้าย 500 มล แล้วจึงนำมาผสมไว้ในขวดเดียวกัน ทำการหุ้มขวดสารละลายเหล็กด้วยกระดาษอลูมินัมให้มิดชิด เพื่อป้องกันแสง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4 ชนิดและปริมาณของสารละลายเหล็กเข้มข้น สูตร MS(1962) ความเข้มข้น 100 X

ชนิดของสาร	ปริมาณสารในสูตร MS(1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาเข้มข้นปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล (ก)
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.3	3.73
$FeSO_4.7H_2O$	27.8	2.78

4.5 การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต

เตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในการทดลองคือ BAP, IBA, NAA, kinetin และ GA_3 โดยแยกเตรียมแต่ละชนิดดังนี้

4.5.1 การเตรียม BAP

ชั่ง BAP 22.5 มก ละลายด้วย 1N KOH (potassium hydroxide) เล็กน้อยพอให้ BAP ละลาย แล้วจึงปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น

4.5.2 การเตรียม IBA

ชั่ง IBA 10 มก ละลายด้วย absolute ethanol เล็กน้อย แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 50 มล ด้วยน้ำกลั่น

4.5.3 การเตรียม NAA

ชั่ง NAA 5 มก ละลายด้วย absolute ethanol เช่นเดียวกับการเตรียม IBA แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น

4.5.4 การเตรียม kinetin

ชั่ง kinetin 5 มก ละลายด้วย 1 N KOH เช่นเดียวกับการเตรียม BAP แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.5.5 การเตรียม GA_3

ชั่ง GA_3 1 มก ละลายด้วย absolute ethanol เช่นเดียวกับการเตรียม IBA แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 50 มล ด้วยน้ำกลั่น

สารควบคุมการเจริญเติบโตทุกชนิดที่เตรียมเสร็จแล้วปิดฝาให้แน่น และเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °ซ

ความเข้มข้นที่ใช้จริงของสารแต่ละตัวดูรายละเอียดจากแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในการทดลอง

5. การเตรียมอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962)

นำส่วนประกอบของอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962) จากน้ำยาเข้มข้นที่เตรียมในข้อ 4 มาผสมให้เข้ากัน โดยใช้สารละลายเข้มข้นแต่ละชนิดดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 5 หน้า 38

ขั้นตอนการทำอาหารสูตร MS ทำได้ดังนี้

ทำการเตรียมโดยใส่น้ำกลั่น 500 มล ลงไปในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มล เติมสารละลายแต่ละชนิดของธาตุอาหารหลักลงไปเขย่าให้เข้ากันดี แล้วจึงเติมธาตุอาหารรอง วิตามิน เหล็ก ฮอร์โมน และน้ำมะพร้าว และสารควบคุมการเจริญเติบโตลงไปตามลำดับ โดยทุกครั้งที่จะเติมสารละลายชนิดใหม่ลงไป จะเขย่าสารละลายที่มีอยู่เดิมให้เข้ากันดีเสียก่อน เพื่อป้องกันการตกตะกอน เมื่อผสมสารชนิดต่าง ๆ ครบตามปริมาณที่กำหนดแล้ว เติมน้ำกลั่นลงไปในสารละลายจนมีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล เทสารละลายทั้งหมดลงในบีกเกอร์ขนาด 2,000 มล นำไปปรับให้มีค่าความเป็นกรด 5.7 โดยใช้ 1N HCl (hydrochloric acid) หรือ 1N KOH การทดลองทุกกรรมวิธีใช้อาหารวุ้น ใส่วุ้นปริมาณ 6 ก/ล ลงไปในสารละลาย หลังจากนั้นจึงนำสารละลายดังกล่าวไปต้ม ต้มจนวุ้นละลายสังเกตได้จากสารละลายมีลักษณะใส แล้วจึงเติมน้ำตาลปริมาณ 30 ก/ล ลงไปต้มต่อจนน้ำตาลละลาย แบ่งอาหารที่เตรียมดังกล่าวเทใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล ขวดละ 30 มล โดยใช้กระบอกตวง แล้วปิดหุ้มขวดทดลองแต่ละขวดด้วยพลาสติกทนร้อน ซึ่งตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 7 x 9 ซม หุ้มทับด้วยกระดาษลอกลายขนาดเดียวกัน แล้วรัด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ด้วยยางรัดของ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอที่ 15 ป (ปอนด์)/ตร น (ตารางนิ้ว) อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 น (นาที)

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบของสารละลายเข้มข้นแต่ละชนิดในอาหารสูตร MS (1962)

ชนิดของสารละลาย	ปริมาณสารละลายเข้มข้นในอาหาร 1 ล (มล)
ธาตุอาหารหลัก	
ความเข้มข้นชนิด 1 โมลาร์	
NH_4NO_3	20.6
KNO_3	18.8
$CaCl_2.2H_2O$	3.0
$MgSO_4.7H_2O$	1.5
KH_2PO_4	1.3
ธาตุอาหารรอง เหล็ก และวิตามิน	
ความเข้มข้นชนิดละ 100 X	
ธาตุอาหารรอง	10
เหล็ก	10
วิตามิน	10
สารควบคุมการเจริญเติบโต	
ความเข้มข้นแต่ละชนิด ตามรายละเอียดของแต่ละการทดลองที่กำหนด	
น้ำมะพร้าว	100

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. วิธีการวิจัย

6.1 **การทดลองที่** 1 ผลของ IBA และ BAP ที่มีต่อการเจริญเติบโตของยอดที่เลี้ยง

6.1.1 พืชทดลอง

ใช้ยอดไฮเดรนเยียซึ่งเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารสูตร MS + IBA และ BAP 0.5 และ 2.25 มก/ล ตามลำดับ และน้ำมะพร้าว 10% โดยเลือกต้นที่มีความสม่ำเสมอกัน สูงประมาณ 1 ซม มีใบ 3 คู่ และตัดใบคู่ล่างออกครึ่งใบตามขวาง

6.1.2 อาหารที่ใช้เลี้ยง

ใช้อาหารวุ้นสูตร MS(1962) ทำการปรับระดับ IBA ให้มีความเข้มข้นในช่วง 0-2.5 มก/ล ร่วมกับ IBA ที่ระดับต่างๆ ในช่วง 0.225-22.5 มก/ล โดยใส่อาหารวุ้น 30 มล/ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล

6.1.3 วิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบทดลองปัจจัยร่วมกัน (factorial) แบบสุ่มสมบูรณ์

กำหนดปัจจัยและระดับความเข้มข้นที่ทดลองดังนี้

6.1.3.1 IBA แบ่งเป็น 4 ระดับคือ 0, 0.05, 0.5 และ 2.5 มก/ล

6.1.3.2 BAP แบ่งเป็น 4 ระดับคือ 0.225, 2.25, 11.25 และ 22.5 มก/ล

การทดลองนี้มี 16 กรรมวิธี (ตารางที่ 6 หน้า 46) แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 6 แสดงกรรมวิธีในการทดลองที่ 1

IBA (มก/ล) \ BAP (มก/ล)	0.225	2.25	11.25	22.5
0	1	2	3	4
0.05	5	6	7	8
0.5	9	10	11	12
2.5	13	14	15	16

6.1.4 สภาพการเลี้ยง

สภาพแสง และอุณหภูมิเหมือนกับสภาพที่ใช้เลี้ยงชิ้นส่วนเริ่มแรก สำหรับเตรียมวัสดุพืชพันธุ์ เพื่อการทดลอง

6.1.5 การบันทึกผล

ทำการบันทึกผลดังนี้

6.1.5.1 วันที่เริ่มพบการแตกยอด

6.1.5.2 ความสูงของต้นเดิม

6.1.5.3 จำนวนใบต่อต้น

6.1.5.4 จำนวนยอดที่เกิดขึ้นต่อชิ้นส่วนพืชที่เลี้ยง

6.1.5.5 ความสูงเฉลี่ยของยอดที่เกิดขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.2 **การทดลองที่ 2** ผลของน้ำมะพร้าวและน้ำตาลที่มีต่อการเจริญเติบโตของยอดที่เลี้ยง

6.2.1 พืชทดลอง

ใช้ยอดไฮเดรนเยีย ที่ปลูกเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารชนิดเดียวกับการทดลองที่ 1 โดยเลือกยอดที่มีความสม่ำเสมอกัน สูงประมาณ 0.8 ซม มีใบ 3 คู่

6.2.2 อาหารที่ใช้เลี้ยง ใช้อาหารสูตร MS แต่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA และ BAP 0.5 และ 2.25 มก/ล ตามลำดับ ทำการปรับระดับของน้ำมะพร้าวในช่วง 0-20% ร่วมกับน้ำตาลที่ระดับต่าง ๆ ในช่วง 2-4% ภาชนะและปริมาณอาหารที่ใช้เหมือนกับการทดลองที่ 1

6.2.3 วิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบทดลองปัจจัยร่วมกัน แบบสุ่มสมบูรณ์ กำหนดปัจจัยและระดับความเข้มข้นที่ทดลองดังนี้

6.2.3.1 น้ำมะพร้าว แบ่งเป็น 3 ระดับ คือ 0, 10 และ 20%

6.2.3.2 น้ำตาล แบ่งเป็น 3 ระดับ คือ 2, 3 และ 4%

การทดลองนี้มี 9 กรรมวิธี (ตารางที่ 7 หน้า 42) แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 7 แสดงกรรมวิธีในการทดลองที่ 2

น้ำตาล (น้ำหนัก/ปริมาตร) (%) \ น้ำมะพร้าว (ปริมาตร/ปริมาตร) (%)	0	10	20
2	1	2	3
3	4	5	6
4	7	8	9

6.2.4 สภาพการเลี้ยง

สภาพแสงและอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเหมือนการทดลองที่ 1

6.2.5 การบันทึกผล

6.2.5.1 ความสูงของต้นเดิม

6.2.5.2 จำนวนใบต่อต้น

6.2.5.3 ลักษณะอื่น ๆ ที่สังเกตพบ เช่นคุณภาพของใบ

6.3 **การทดลองที่ 3** ผลของชิ้นส่วนลักษณะต่าง ๆ ซึ่งใช้เลี้ยงที่มีต่อการเจริญเติบโต

6.3.1 พืชทดลอง

ใช้ยอดพันธุ์ไฮเดรนเยีย ที่ปลูกเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารวุ้นสูตรเดียวกับการทดลองที่ 1 แล้วนำมาตัดแบ่งในลักษณะต่าง ๆ โดยใช้ต้นพันธุ์ที่มีอายุเท่ากัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.3.2 อาหารที่ใช้เลี้ยง

ใช้อาหารวุ้นสูตร MS ชนิดและระดับของสารควบคุมการเจริญที่ใช้เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 + น้ำมะพร้าว 10% ภาชนะและปริมาณอาหารที่ใช้เหมือนกับการทดลองที่ 1

6.3.3 วิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) มี 6 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธี มี 5 ซ้ำ

การทดลองแยกเป็นกรรมวิธีต่าง ๆ ดังนี้คือ

กรรมวิธีที่ 1 ยอด

กรรมวิธีที่ 2 ข้อ

กรรมวิธีที่ 3 ยอดแบ่งเป็น 2 ส่วนตามยาว

กรรมวิธีที่ 4 ข้อแบ่งเป็น 2 ส่วนตามยาว

กรรมวิธีที่ 5 ยอดแบ่งเป็น 4 ส่วนตามยาว

กรรมวิธีที่ 6 ข้อแบ่งเป็น 4 ส่วนตามยาว

6.3.4 สภาพการเลี้ยง

สภาพแสงและอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเหมือนการทดลองที่ 1

6.3.5 การบันทึกผล

6.3.5.1 วันที่เริ่มพบการเกิดยอด

6.3.5.2 จำนวนยอดที่เกิดขึ้นต่อชิ้นส่วนพืชที่เลี้ยง

6.3.5.3 ความสูงเฉลี่ยของยอดที่เกิดขึ้น

6.3.5.4 ลักษณะอื่น ๆ ที่พบ เช่นอาการฉ่ำน้ำ

6.3.5.5 นำตัวอย่างใบจากต้นที่มีลักษณะฉ่ำน้ำไปทำการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาเพื่อดูภาพตัดขวางของใบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.4 **การทดลองที่ 4** ผลของ GA_3 ที่มีต่อการเจริญเติบโตของยอดที่เลี้ยง

6.4.1 พืชทดลอง

ใช้ยอดไฮเดรนเยีย ที่ปลูกเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

6.4.2 อาหารที่ใช้เลี้ยง

ใช้อาหารวุ้นสูตร MS + IBA + BAP 0.05 และ 2.25 มก/ล ตามลำดับ + น้ำมะพร้าว 10% ทำการปรับระดับของ GA_3 ในอาหารนี้ให้มีระดับต่าง ๆ กันในช่วง 0-1 มก/ล GA_3 ที่ใช้ จะทำการฆ่าเชื้อโดยการกรองโดยใช้ millipore filterขนาด pore size 0.22 ไมครอน ภาชนะและปริมาณอาหารที่ใช้เหมือนกับการทดลองที่ 1

6.4.3 วิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มี 5 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ

การทดลองแยกเป็นกรรมวิธีต่าง ๆ ดังนี้คือ

กรรมวิธีที่ 1 ไม่ใส่ GA_3

กรรมวิธีที่ 2 ใส่ GA_3 0.1 มก/ล

กรรมวิธีที่ 3 ใส่ GA_3 0.2 มก/ล

กรรมวิธีที่ 4 ใส่ GA_3 0.4 มก/ล

กรรมวิธีที่ 5 ใส่ GA_3 1.0 มก/ล

6.4.4 สภาพการเลี้ยง

สภาพแสงและอุณหภูมิที่ใช้เหมือนการทดลองที่ 1

6.4.5 การบันทึกผล

6.4.5.1 ความสูงของต้นเดิม

6.4.5.2 จำนวนใบต่อต้น

6.4.5.3 จำนวนยอดที่เกิดขึ้นต่อชิ้นส่วนพืชที่เลี้ยง

6.4.5.4 ความสูงเฉลี่ยของยอดที่เกิดขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.5 **การทดลองที่** 5 ผลของ NAA และ kinetin ที่มีต่อการเจริญเติบโตของยอดที่เลี้ยง

6.5.1 พืชทดลอง

ใช้ยอดไฮเดรนเยีย ซึ่งปลูกเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารสูตรเดียวกับการทดลองที่ 1 โดยเลือกต้นที่มีความสม่ำเสมอกัน สูงประมาณ 1 ซม มีใบ 2 คู่ ตัดใบคู่ล่างออกตามขวางประมาณครึ่งใบ

6.5.2 อาหารที่ใช้เลี้ยง

ใช้อาหารวุ้นสูตร MS โดยใช้ออ๊อกซิน NAA และปรับระดับ NAA ในช่วง 0-0.5 มก/ล ร่วมกับ kinetin ที่ระดับต่าง ๆ ในช่วง 0.125-0.75 มก/ล ภาชนะที่ใช้และปริมาณอาหารต่อขวด เหมือนกับการทดลองที่ 1

6.5.3 วิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบทดลองปัจจัยร่วมกันแบบสุ่มสมบูรณ์ กำหนดปัจจัยและระดับความเข้มข้นที่ทดลองดังนี้

6.5.3.1 NAA แบ่งเป็น 4 ระดับคือ 0, 0.125, 0.25 และ 0.5 มก/ล

6.5.3.2 kinetin แบ่งเป็น 4 ระดับ คือ 0.125, 0.25, 0.5 และ 0.75 มก/ล

การทดลองนี้มี 16 กรรมวิธี (ตารางที่ 8 หน้า 46) แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 8 แสดงกรรมวิธีในการทดลองที่ 5

NAA (มก/ล) / kinetin (มก/ล)	0	0.125	0.25	0.5
0.125	1	2	3	4
0.25	5	6	7	8
0.5	9	10	11	12
0.75	13	14	15	16

6.5.4 สภาพการเลี้ยง

สภาพแสงและอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเหมือนการทดลองที่ 1

6.5.5 การบันทึกผล

6.5.5.1 ความสูงของต้นเดิม

6.5.5.2 จำนวนใบต่อต้น

6.5.5.3 จำนวนยอดที่เกิดขึ้นต่อชิ้นส่วนพืชที่เลี้ยง

6.6 **การทดลองที่ 6** ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตของยอดที่เลี้ยง

6.6.1 พืชทดลอง

ใช้ยอดไฮเดรนเยียที่ปลูกเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารวุ้นสูตรเดียวกับการทดลองที่ 1 โดยเลือกต้นที่มีความสม่ำเสมอกัน มีใบ 3 คู่ ความสูงประมาณ 1 ซม ตัดใบคู่ล่างออกครึ่งใบตามขวาง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.6.2 อาหารที่ใช้เลี้ยง

ใช้อาหารสูตรเดียวกับการทดลองที่ 4

6.6.3 วิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มี 3 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ การทดลองแยกเป็นกรรมวิธีต่าง ๆ ดังนี้คือ

กรรมวิธีที่ 1 22 °ซ

กรรมวิธีที่ 2 26 °ซ

กรรมวิธีที่ 3 28 °ซ

6.6.4 สภาพการเลี้ยง

เลี้ยงโดยวางขวดทดลองไว้ในตู้ ซึ่งมีการควบคุมอุณหภูมิและแสง ภายในตู้ติดหลอดฟลูออเรสเซนต์ ชั้นละ 3 หลอด โดยมีระยะห่างจากขวดทดลอง 1/2 ฟุต ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ ระยะเวลาที่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง อุณหภูมิภายในตู้แตกต่างกันไปตามวิธีการทดลองที่กำหนด

6.6.5 การบันทึกผล

6.6.5.1 วันที่เริ่มพบการแตกยอด

6.6.5.2 จำนวนยอดที่เกิดขึ้นต่อชิ้นส่วนพืชที่เลี้ยง

6.6.5.3 ความสูงของต้นเดิม

6.6.5.4 จำนวนใบต่อต้น

6.6.5.5 ความสูงเฉลี่ยของยอดที่เกิดขึ้น

7. การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

ตัดชิ้นส่วนใบไฮเดรนเยียที่ได้จากต้นที่เลี้ยงในสภาพธรรมชาติ ใบปกติและใบฉ่ำน้ำที่เกิดขึ้นในสภาพปลอดเชื้อ มาทำการฆ่าเซลล์และรักษาสภาพเซลล์ ด้วยน้ำยา FAA (Formalin-Acetic-Alcohol) ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมของ ethyl alcohol(95%) 50 มล. glacial

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

acetic acid 5 มล, formaldehyde(37-41%) 10 มล และน้ำกลั่น 35 มล จากนั้นทำการดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยใช้ ethyl alcohol (95%), absolute alcohol, tertiary butyl alcohol (TBA) และน้ำกลั่น โดยผสมไว้เป็นอัตราส่วนต่างกัน 4 ระดับตามรายละเอียดข้างล่าง (Johansen, 1940)

อัตราส่วนของสารเคมีที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซล

grade (%)	95% ethyl alcohol (มล)	absolute alcohol (มล)	TBA (มล)	น้ำกลั่น (มล)
70	50	-	20	30
85	50	-	35	15
95	50	-	50	-
100	-	25	75	-

ในการดึงน้ำออกจากเซลล์ทั้ง 4 ระดับนี้ ใช้เวลาช่วงละ 12 ชม เมื่อครบทั้ง 4 ระดับแล้วจะใช้ TBA บริสุทธิ์ อีก 2-3 ครั้ง ครั้งละ 12 ชม หลังจากนั้นทำให้พาราฟินแทรกซึมเข้าเนื้อเยื่อโดยใช้ส่วนผสมของ tertiary butyl alcohol และ paraffin oil อัตราส่วน 1:1 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม แล้วจึงเทรวมกับ paraplast ที่หลอมไว้ล่วงหน้า ให้มีอัตราส่วน 1:1 นำไปวางไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 56-58 °ซ เป็นเวลา 24 ชม แล้วจึงเปลี่ยนมาใช้ paraplast ที่หลอมไว้ล่วงหน้าเก็บไว้ในตู้อบเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นทำการฝังชิ้นส่วนที่จะศึกษาดังกล่าวลงใน paraplast เก็บไว้ในตู้เย็นประมาณ 24 ชม นำชิ้นส่วนใบไปฝานเป็นชิ้นบาง ๆ ตามขวางให้ชิ้นฝานมีความหนา 10 ไมครอน ด้วยเครื่องฝานเนื้อเยื่อแบบใช้มือหมุน(rotary microtome) ติดแผ่นเนื้อเยื่อบนกระจกสไลด์ ด้วยน้ำยายึดเนื้อเยื่อ คือ albumin เก็บสไลด์ในตู้อบที่อุณหภูมิ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

35-40 °ซ และทำการย้อมสีเนื้อเยื่อด้วย Delafield's hematoxylin เป็นเวลา 10 นาที ปิดแผ่นสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์ โดยอาศัยสารตัวกลางสำหรับยึดปิดแผ่นสไลด์ด้วย canada balsum เมื่อสไลด์แห้งทำการศึกษาเปรียบเทียบใบไฮเดรนเยียดังกล่าวจากกล้องจุลทรรศน์ และทำการบันทึกภาพโดยใช้กล้อง Olympus OM-1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved