บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

1. วัสดุ และอุปกรณ์

1.1 ก้านใบของต้นเท้ายายม่อม ที่เลี้ยงในหลอดทดลองบนอาหารสูตร MS ที่มี BAP1 มก/ล

1.2 ตู้กรองอากาศบริสุทธิ์ (laminar air flow)

1.3 ชั้นสำหรับวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีระบบให้แสงฟลูออเรสเซนส์ ให้ความเข้มแสงประมาณ 2,000 ลักซ์

1.4 กล้องจุลทรรศน์ (dissecting microscope)

1.5 เครื่องชั่งไฟฟ้า ชนิดทศนิยม 3 และ 4 ตำแหน่ง

1.6 ตะแกรงสำหรับวางหลอดทดลอง

1.7 เครื่องเขย่า

1.8 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

1.9 หม้อนึ่งความดันไอ

1.10 เตาไมโครเวฟ

1.11 ขวดปรับปริมาตรขนาด 100, 500 และ 1,000 มล

1.12 ขวดรูปชมพู่ (erlenmyer flask) ขนาด 125 และ 250 มล

1.13 บีกเกอร์ขนาด 10, 50, 100, 1,000 และ 2,000 มล

1.14 กระบอกวัดปริมาตรขนาด 10, 50 และ 100 มล

1.15 ปิเปตขนาด 0.5, 1, 5 และ 10 มล

1.16 ขวดใส่สารละลายเข้มข้นขนาด 1,000 มล

1.17 หลอดทดลองขนาด 25x150 มม

1.18 ช้อนตักสาร

1.19 แท่งแก้วสำหรับคนสารละลาย

1.20 วัสดุที่ใช้ในตู้กรองอากาศได้แก่

1.20.1 ด้ามมีดผ่าตัดเบอร์ 3

1.20.2 ใบมีดผ่าตัดเบอร์ 10 และ 11

1.20.3 ใบมีดโกนที่ตัดเป็นใบมีดเล็กขนาด 2x10 มม

1.20.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.20.5 ปากคีบ ขนาดยาว 140 และ 180 มม

1.20.6 ถุงพลาสติกตัดเป็นแผ่นสี่เหลี่ยมขนาด 70x90 มม

1.20.7 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 3

1.20.8 หลอดทดลองขนาด 25x150 มม สำหรับใส่แอลกอฮอล์

1.20.9 จานเลี้ยงเชื้อ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 95 และ 140 มม

1.20.10 บีกเกอร์ขนาด 50 มล สำหรับวางหลอดทดลองที่ใส่แอลกอฮอล์

1.21 วัสดุอื่นๆ เช่น ยางรัดของ แผ่นป้าย (label) กระดาษซับน้ำ กระดาษลอกลาย ผงวุ้นตราเฮลิคอปเตอร์ น้ำตาลซูโครส ฯลฯ

1.22 น้ำกลั่น ซึ่งกลั่นจากเครื่องแก้ว

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับฆ่าเชื้อ

2.1.1 Ethanol ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์

2.1.2 Clorox ของบริษัท The Clorox Co.,USA.

2.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมอาหาร

2.2.1 เกลือให้ธาตุอาหารหลักต่างๆ ตามสูตร MS (1962)

2.2.2 เกลือให้ธาตุอาหารรองต่างๆ ตามสูตร MS (1962)

2.2.3 สารอินทรีย์ต่างๆ ตามสูตร MS (1962)

2.2.4 สารละลายเหล็ก ความเข้มข้นตามสูตร MS (1962)

2.2.5 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

2.2.5.1 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) ของบริษัท Sigma Chemical Co.,USA.

2.2.5.2 6-benzylaminopurine (BAP) ของบริษัท Sigma Chemical Co.,USA.

2.2.6 Potassium hydroxide (KOH) 1 M

2.2.7 Hydrochloric acid (HCl) 1 M

2.3 สารที่ใช้ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

2.3.1 Ethanol ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์

2.3.2 Glacial acetic acid

2.3.3 Formalin

2.3.4 TBA (tert-butylalcohol)

2.3.5 Absolute alcohol

2.3.6 สี Erythrosin

2.3.7 Paraffin

2.3.8 Liquid paraffin

2.3.9 Xylene

2.3.10 สี Haematoxylin

2.3.11 น้ำยา Canada balsum

3. การเตรียมต้นพืชทดลอง

ต้นพืชทดลองที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้จากก้านใบของต้นเท้ายายม่อม ที่เลี้ยงในหลอดทดลองได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่อันเนื่องมาจากพระราชดำริ

4. การเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution)

4.1 การเตรียมธาตุอาหารหลัก

เตรียมธาตุอาหารหลักที่ใช้ในสูตร MS (1962) ความเข้มข้น 10X โดยชั่งสารแต่ละชนิดในตารางที่ 2 โดยละลายสารทีละชนิดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตร ขนาด 1,000 มล แล้วเทใส่ขวดเก็บสารละลายเข้มข้น ปิดฝา เก็บในตู้เย็น

ตารางที่ 2 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้น ของธาตุอาหารหลักสูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยา ความเข้มข้น 10x (ก/ล)
NH_4NO_3	1,650	16.50
KNO_3	1,900	19.00
$CaCl_2.2H_2O$	44	0.44
$MgSO_4.7H_2O$	370	3.70
KH_2PO_4	170	1.70

4.2 การเตรียมธาตุอาหารรอง

การเตรียมธาตุอาหารรองสูตร MS (1962) โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน ให้ความเข้มข้นของสาร มากกว่าที่ใช้จริง 100 เท่า (100X) เตรียมน้ำยาให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล โดยใช้น้ำหนักของสารดังกล่าวต่อไปนี้ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ชนิดและปริมาณสาร ในสารละลายเข้มข้น ของธาตุอาหารรองสูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) 100x (มก/ล)
$CuSO_4.5H_2O$	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_4	6.20	620
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	25
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	2.5

4.3 การเตรียมสารอินทรีย์

การเตรียมสารอินทรีย์สูตร MS (1962) ทำเป็นสารละลายเข้มข้น รวมไว้ในขวดเดียวกัน ความเข้มข้นของสารมากกว่าที่ใช้จริง 100 เท่า เตรียมน้ำยาให้มีปริมาตรสุดท้ายคือ 1,000 มล โดยใช้น้ำหนักของสารดังกล่าวต่อไปนี้ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ชนิดและปริมาณสาร ในสารละลายเข้มข้น ของสารอินทรีย์สูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาความเข้มข้น 100X (มก/ล)
Glycine	2.00	200
Thiamine.HCl	0.25	25
Pyridoxine.HCl	0.25	25
Nicotinic acid	0.25	25
Myo-inositol	100	10,000

4.4 การเตรียมสารละลายเหล็กเข้มข้น

เตรียม FeEDTA สูตร MS (1962) ซึ่งประกอบด้วย $FeSO_4.7H_2O$ และ $Na_2EDTA.2H_2O$ โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้น รวมไว้ในขวดเดียวกัน ความเข้มข้นของสารมากกว่าที่ใช้จริง 100X เตรียมน้ำยาให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล ทำการเตรียมโดยชั่งสารแต่ละชนิดละลายน้ำให้มีปริมาตรสุดท้ายของแต่ละส่วนเป็น 500 มล (ตารางที่ 5) แล้วจึงนำมาผสมไว้ในขวดเดียวกัน โดยเก็บไว้ในขวดสีชาเพื่อป้องกันแสง

ตารางที่ 5 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของเหล็กสูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาความเข้มข้น 100X (ก/ล)
$FeSO_4.7H_2O$	27.8	2.78
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.3	3.73

4.5 การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต

4.5.1 <u>การเตรียม 2,4-D</u>

ชั่ง 2,4-D 10 มก ละลายด้วยสารละลาย absolute ethanol เล็กน้อย เพียงพอให้สารละลายได้ แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริง (ตารางที่ 7) ดูรายละเอียดจากแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในแต่ละการทดลอง

4.5.2 <u>การเตรียม BAP</u>

ชั่ง BAP 10 มก ละลายด้วย 1 N NaOH จำนวนเล็กน้อยเพียงพอให้ละลายได้ แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริงดูรายละเอียดจากแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในการทดลอง

5. การเตรียมอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962)

นำส่วนประกอบของอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962) จากน้ำยาเข้มข้น ที่เตรียมในข้อที่ 4 มาผสมให้เข้ากัน โดยใช้สารละลายเข้มข้นแต่ละชนิด ดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 6 ขั้นตอนการเตรียมอาหารสูตร MS (1962) ทำดังนี้

5.1 ใส่น้ำกลั่นลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มล ประมาณ 1/3 ของขวด แล้วเติมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก ลงไปทีละชนิด

5.2 เติมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรอง สารอินทรีย์ เหล็ก และสารควบคุมการเจริญเติบโตลงไป ตามลำดับโดยเขย่าขวดให้น้ำยาผสมกันดี ระหว่างแต่ละครั้งที่เติม

5.3 ละลายน้ำตาลใส่ลงไป แล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไปจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล

5.4 เทสารละลายลงในบีกเกอร์ขนาด 2,000 มล จากนั้นนำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้ 5.7 โดยใช้ 1 N KOH หรือ 1 N HCl

5.5 ใส่วุ้นลงในอาหารแล้วนำไปต้มจนวุ้นละลาย

5.6 เตรียมใส่หลอดทดลองขนาด 25x150 มม ปริมาณ 10 มล/หลอด แล้วปิดปากหลอดด้วยแผ่นพลาสติก และกระดาษฟอยล์ แล้วรัดด้วยยางรัดของ

5.7 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่ 15 ป(ปอนด์)/น^2(ตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบของสารละลายเข้มข้นแต่ละชนิด ในอาหารสูตร MS (1962)

ชนิดของสารละลาย	ปริมาณสารละลายเข้มข้นในอาหาร 1 ลิตร (มล)
สารละลายธาตุอาหารหลักความเข้มข้น 10X	100
สารละลายธาตุอาหารรองความเข้มข้น 100X	10
สารละลายสารอินทรีย์ความเข้มข้น 100X	10
สารละลายเหล็กความเข้มข้น 100X	10
สารควบคุมการเจริญเติบโต	*
น้ำตาลซูโครส (น้ำหนัก/ปริมาตร)	30 ก/ล
ผงวุ้น (น้ำหนัก/ปริมาตร)	8 ก/ล

หมายเหตุ * = ปริมาณที่ใช้ขึ้นกับความเข้มข้นในแต่ละกรรมวิธีในการทดลอง

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางที่ 7 ปริมาณการใช้สารละลายเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ละชนิดตามความเข้มข้นที่ใช้ในแต่ละกรรมวิธี

ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต	ปริมาณสารละลายเข้มข้นในอาหาร 1 ลิตร (มล)
BAP ความเข้มข้น 0.005 มก/ล	0.05
BAP ความเข้มข้น 0.025 มก/ล	0.25
BAP ความเข้มข้น 0.05 มก/ล	0.5
BAP ความเข้มข้น 0.5 มก/ล	5
BAP ความเข้มข้น 1.0 มก/ล	10
BAP ความเข้มข้น 2.0 มก/ล	20
BAP ความเข้มข้น 4.0 มก/ล	40
2,4-D ความเข้มข้น 0.005 มก/ล	0.05
2,4-D ความเข้มข้น 0.0125 มก/ล	0.125
2,4-D ความเข้มข้น 0.025 มก/ล	0.25
2,4-D ความเข้มข้น 0.05 มก/ล	0.5
2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มก/ล	1
2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มก/ล	2
2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มก/ล	5
2,4-D ความเข้มข้น 5.0 มก/ล	50

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

6. วิธีการวิจัย

6.1 การทดลองที่ 1 ผลของชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นต่อการเจริญและการพัฒนาของต้นเท้ายายม่อม

แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลองย่อยดังนี้

การทดลองที่ 1.1 ผลของการเลี้ยงก้านใบต่อการเกิดต้นใหม่

วิธีการทดลอง

ใช้อาหารวุ้นสูตร MS (วิธีการเตรียมดูข้อ 5) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ 2,4-D 0.05 มก/ล โดยเตรียมใส่หลอดทดลองขนาด 25x150 มม ปริมาตรหลอดละ 10 มล

ตัดชิ้นส่วนตามขวางจากก้านใบตำแหน่งต่างๆ จากโคนก้านใบขึ้นมาให้แต่ละชิ้นมีขนาดหนา 2 มม การนับตำแหน่งใบนับใบแก่สุดเป็นใบที่ 1 (ภาพที่ 4)

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (factorial in CRD) รวม 20 กรรมวิธี โดยแต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำดังนี้

ตารางที่ 8 กรรมวิธีในการทดลองที่ 1.1

ตำแหน่งใบ	ตำแหน่งต่างๆนับจากโคนก้านใบ				
	1	2	3	4	5
1	T1	T2	T3	T4	T5
2	T6	T7	T8	T9	T10
3	T11	T12	T13	T14	T15
4	T16	T17	T18	T19	T20

หมายเหตุ ตำแหน่งใบที่ 1 แก่ที่สุด จนถึง ตำแหน่งที่ 4 เป็นใบอ่อน

การบันทึกผล

1. บันทึกการเจริญเติบโตดังนี้
    1.1 จำนวนวันเฉลี่ยเมื่อเริ่มเกิดยอด
    1.2 จำนวนต้นเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง
    1.3 เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นใหม่
    1.4 นำตัวอย่างชิ้นส่วน ไปศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา
2. บันทึกการเจริญของรากดังนี้
    2.1 จำนวนวันเฉลี่ยเมื่อเริ่มเกิดราก
    2.2 ลักษณะอื่นๆ เช่น ความผิดปกติของราก สี และขนาด

ภาพที่ 4 ลักษณะต้นซึ่งตัดชิ้นส่วนก้านใบมาทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

การทดลองที่ 1.2 ผลของการเลี้ยงปลายรากต่อการเกิดต้นใหม่

วิธีการทดลอง

ใช้อาหารวุ้นสูตร MS (วิธีการเตรียมดูข้อ 5) โดยเตรียมใส่หลอดขนาด 25x150 มม ปริมาตรหลอดละ 10 มล

ตัดชิ้นส่วนรากขนาด 2 มม จากปลายรากเข้ามา 5 ตำแหน่ง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ รวม 5 กรรมวิธี โดยแต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ปลายรากตำแหน่งที่ 1 (ปลายสุด)
กรรมวิธีที่ 2 ปลายรากตำแหน่งที่ 2
กรรมวิธีที่ 3 ปลายรากตำแหน่งที่ 3
กรรมวิธีที่ 4 ปลายรากตำแหน่งที่ 4
กรรมวิธีที่ 5 ปลายรากตำแหน่งที่ 5

การบันทึกผล

1. บันทึกการเจริญเติบโตของต้นดังนี้
   1.1 จำนวนวันเฉลี่ยเมื่อเริ่มเกิดยอด
   1.2 จำนวนต้นเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง
   1.3 เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นใหม่
   1.4 คุณภาพของต้นใหม่
2. บันทึกการเจริญของรากดังนี้
   2.1 จำนวนวันเฉลี่ยเมื่อเริ่มเกิดราก
   2.2 นำตัวอย่างรากไปศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

การทดลองที่ 1.3 ผลของการเลี้ยงแผ่นใบต่อการเจริญและพัฒนา

วิธีการทดลอง

ใช้อาหารวุ้นสูตร MS (วิธีการเตรียมดูข้อ 5) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ 2,4-D และ BAP ความเข้มข้นตามกรรมวิธีต่างๆ โดยเตรียมใส่หลอดทดลองขนาด 25x150 มม ปริมาตรหลอดละ 10 มล

ตัดแผ่นใบ (ภาพที่ 5) ให้มีเส้นกลางใบติดด้วย ให้มีขนาด 5 x 5 มม

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ รวม 25 กรรมวิธี โดยแต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ ดังนี้

ตารางที่ 9 กรรมวิธีในการทดลองที่ 1.3

BAP (มก/ล)	2,4-D (มก/ล)				
	0	0.025	0.05	0.1	0.2
0	T1	T6	T11	T16	T21
0.5	T2	T7	T12	T17	T22
1.0	T3	T8	T13	T18	T23
2.0	T4	T9	T14	T19	T24
4.0	T5	T10	T15	T20	T25

การบันทึกผล

1. บันทึกการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วน
   - 1.1 จำนวนยอดเฉลี่ยที่เกิดขึ้น
   - 1.2 เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส
   - 1.3 ลักษณะของแคลลัส เช่นอาการผิดปกติ สี เป็นต้น
2. นำตัวอย่างแผ่นใบไปศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

ภาพที่ 5 ชิ้นส่วนแผ่นใบที่นำมาทดลอง

6.2 การทดลองที่ 2 ผลของ BAP และ 2,4-D ต่อการเกิดยอดจากชิ้นส่วนพืชที่เลี้ยง

แบ่งออกเป็น 3 การทดลองย่อยดังนี้

การทดลองที่ 2.1 ผลของ BAP และ 2,4-D ต่อการเกิดยอดจากแคลลัส

วิธีการทดลอง

ใช้อาหารวุ้นสูตร MS (วิธีการเตรียมดูข้อ 5) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ 2,4-D และ BAP ความเข้มข้นตามกรรมวิธีต่างๆ โดยเตรียมใส่หลอดทดลองขนาด 25x150 มม ปริมาตรหลอดละ 10 มล

คัดชิ้นส่วนแคลลัส (ภาพที่ 6)ให้มีขนาด 2x2 มม

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์รวม 20 กรรมวิธี (ตารางที่ 10) กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ ดังนี้

1) ความเข้มข้น BAP 4 ระดับ คือ 0, 0.005, 0.05 และ 0.5 มก/ล

2) ความเข้มข้น 2,4-D 5 ระดับ คือ 0,0.005,0.05,0.5 และ 5 มก/ล

ตารางที่ 10 กรรมวิธีในการทดลองที่ 2.1

BAP (มก/ล)	2,4-D (มก/ล)				
	0	0.005	0.05	0.5	5.0
0	T1	T5	T9	T13	T17
0.005	T2	T6	T10	T14	T18
0.05	T3	T7	T11	T15	T19
0.5	T4	T8	T12	T16	T20

การบันทึกผล

1. บันทึกการเจริญเติบโตของยอดดังนี้
   1.1 จำนวนวันเฉลี่ยเมื่อเริ่มเกิดยอด
   1.2 จำนวนยอดเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง
2. บันทึกการเจริญของรากดังนี้
   2.1 เปอร์เซ็นต์การเกิดราก
   2.2 จำนวนวันเฉลี่ยเมื่อเริ่มเกิดราก
   2.3 ลักษณะอื่นๆ เช่น ความผิดปกติของราก สี และขนาด

ภาพที่ 6 ชิ้นส่วนแคลลัสที่นำมาทดลอง

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

การทดลองที่ 2.2 ผลของ BAP และ 2,4-D ต่อการเกิดยอดจากก้านใบ

วิธีการทดลอง

ใช้อาหารวุ้นสูตร MS (วิธีการเตรียมดูข้อ 5) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ 2,4-D และ BAP ความเข้มข้นตามกรรมวิธีต่างๆ โดยเตรียมใส่หลอดทดลองขนาด 25x150 มม ปริมาตรหลอดละ 10 มล

ตัดโคนก้านใบให้มีขนาด 5 มม

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์รวม 3 กรรมวิธี โดยแต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 อาหารไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต

กรรมวิธีที่ 2 อาหารเติม BAP 1 มก/ล

กรรมวิธีที่ 3 อาหารเติม 2,4-D 0.05 มก/ล

การบันทึกผล

1. บันทึกการเจริญเติบโตของต้นดังนี้
   1.1 จำนวนวันเฉลี่ยเมื่อเริ่มเกิดยอด
   1.2 จำนวนยอดเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง
   1.3 เปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนที่เกิดยอด
2. บันทึกการเจริญของรากดังนี้
   2.1 จำนวนวันเฉลี่ยเมื่อเริ่มเกิดราก
   2.2 ลักษณะอื่นๆ เช่น ความผิดปกติของราก สี และขนาด

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

การทดลองที่ 2.3 ผลของ BAP และ 2,4-D ต่อการเกิดยอดของชิ้นส่วนราก

วิธีการทดลอง

ใช้อาหารวุ้นสูตร MS (วิธีการเตรียมดูข้อ 5) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ 2,4-D และ BAP ความเข้มข้นตามกรรมวิธีต่างๆ โดยเตรียมใส่หลอดทดลองขนาด 25x150 มม ปริมาตรหลอดละ 10 มล

ตัดปลายรากให้มีขนาด 5 มม

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์รวม 4 กรรมวิธี โดยแต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 อาหารไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต

กรรมวิธีที่ 2 อาหารเติม BAP 1 มก/ล

กรรมวิธีที่ 3 อาหารเติม 2,4-D 0.05 มก/ล

กรรมวิธีที่ 4 อาหารเติม BAP 1 มก/ล และ 2,4-D 0.05 มก/ล

การบันทึกผล

1. บันทึกการเจริญเติบโตของต้นดังนี้
   - 1.1 จำนวนวันเฉลี่ยเมื่อเริ่มเกิดยอดและแคลลัส
   - 1.2 จำนวนยอดเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง
   - 1.3 คุณภาพของต้นใหม่
2. บันทึกการเจริญของรากดังนี้
   - 2.1 จำนวนวันเฉลี่ยเมื่อเริ่มเกิดราก
   - 2.2 ลักษณะอื่นๆ เช่น ความผิดปกติของราก สี และขนาด

6.3 การทดลองที่ 3 ผลของ BAP และ 2,4-D ต่อการสร้างยอดจากแคลลัส แบบต่างๆ

แบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อยดังนี้

การทดลองที่ 3.1 ผลของ BAP และ 2,4-D ต่อการพัฒนาของแคลลัสแบบเซลล์เกาะกันหลวมๆ

วิธีการทดลอง

ใช้อาหารวุ้นสูตร MS (วิธีการเตรียมดูข้อ 5) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ 2,4-D และ BAP ความเข้มข้นตามกรรมวิธีต่างๆ โดยเตรียมใส่หลอดทดลองขนาด 25x150 มม ปริมาตรหลอดละ 10 มล

ตัดชิ้นส่วนแคลลัสให้มีขนาด 5x5x5 มม

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์รวม 8 กรรมวิธี โดยแต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 อาหารเติม BAP 0.5 มก/ล
กรรมวิธีที่ 2 อาหารเติม BAP 1.0 มก/ล
กรรมวิธีที่ 3 อาหารเติม BAP 2.0 มก/ล
กรรมวิธีที่ 4 อาหารเติม BAP 4.0 มก/ล
กรรมวิธีที่ 5 อาหารเติม 2,4-D 0.025 มก/ล
กรรมวิธีที่ 6 อาหารเติม 2,4-D 0.05 มก/ล
กรรมวิธีที่ 7 อาหารเติม 2,4-D 0.10 มก/ล
กรรมวิธีที่ 8 อาหารเติม 2,4-D 0.20 มก/ล

การบันทึกผล

1. บันทึกการเจริญเติบโตของต้นดังนี้
   1.1 จำนวนวันเฉลี่ยเมื่อเริ่มเกิดยอด
   1.2 จำนวนยอดเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง
   1.3 จำนวนต้นเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

2. บันทึกการเจริญของรากดังนี้

2.1 เปอร์เซ็นต์การเกิดราก

2.2 จำนวนวันเฉลี่ยเมื่อเริ่มเกิดราก

2.3 ลักษณะอื่นๆ เช่น ความผิดปกติของราก สี และขนาด

การทดลองที่ 3.2 ผลของ BAP และ 2,4-D ต่อการพัฒนาของแคลลัสที่เกาะกันแน่น

วิธีการทดลอง

ใช้อาหารวุ้นสูตร MS (วิธีการเตรียมดูข้อ 5) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ 2,4-D และ BAP ความเข้มข้นตามกรรมวิธีต่างๆ โดยเตรียมใส่หลอดทดลองขนาด 25x150 มม ปริมาตรหลอดละ 10 มล

ตัดแคลลัสที่เกาะกันแน่นเป็นลักษณะคล้ายยอดมาเลี้ยง 1 ก้อน/หลอด

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์รวม 25 กรรมวิธี (ตารางที่ 11) โดยแต่ละกรรมวิธี มี 3 ซ้ำ ดังนี้

ตารางที่ 11 กรรมวิธีในการทดลองที่ 3.2

BAP (มก/ล)	2,4-D (มก/ล)				
	0	0.0125	0.025	0.05	0.1
0	T1	T6	T11	T16	T21
0.025	T2	T7	T12	T17	T22
0.5	T3	T8	T13	T18	T23
1.0	T4	T9	T14	T19	T24
2.0	T5	T10	T15	T20	T25

การบันทึกผล

1. บันทึกการเจริญเติบโตของต้นดังนี้
   1.1 จำนวนวันเฉลี่ยเมื่อเริ่มเกิดยอด
   1.2 จำนวนยอดเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง
   1.3 จำนวนต้นเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง
2. บันทึกการเจริญของรากดังนี้
   2.1 เปอร์เซ็นต์การเกิดราก
   2.2 จำนวนวันเฉลี่ยเมื่อเริ่มเกิดราก
   2.3 ลักษณะอื่นๆ เช่น ความผิดปกติของราก สี และขนาด

6.4 การทดลองที่ 4 ผลของการตัดแบ่งชิ้นส่วนที่มีต่อการเจริญเติบโต และการเพิ่มปริมาณของยอดใหม่

แบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อยดังนี้

การทดลองที่ 4.1 การตัดแบ่งยอดกระจุก

วิธีการทดลอง

ใช้อาหารวุ้นสูตร MS (วิธีการเตรียมดูข้อ 5) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ 2,4-D 0.05 มก/ล โดยเตรียมใส่หลอดทดลองขนาด 25x150 มม ปริมาตรหลอดละ 10 มล

ผ่าแบ่งยอดจากยอดกระจุก (bud cluster) ตามกรรมวิธีต่างๆ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์รวม 3 กรรมวิธี โดยแต่ละกรรมวิธีมี 8 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไม่ผ่าแบ่งยอด ขนาด 2 มม

กรรมวิธีที่ 2 ผ่าครึ่งตามยาว แต่ละชิ้นขนาด 1 มม

กรรมวิธีที่ 3 ผ่าสี่ส่วนตามยาว แต่ละชิ้นขนาด 0.5 มม

การบันทึกผล

1. บันทึกการเจริญเติบโตของต้นดังนี้
   1.1 จำนวนวันเฉลี่ยเมื่อเริ่มเกิดยอด
   1.2 จำนวนยอดเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง
   1.3 จำนวนต้นเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง
2. บันทึกการเจริญของรากดังนี้
   2.1 เปอร์เซ็นต์การเกิดราก
   2.2 จำนวนวันเฉลี่ยเมื่อเริ่มเกิดราก
   2.3 ลักษณะอื่นๆ เช่น ความผิดปกติของราก สี และขนาด

(ก) (ข)

ภาพที่ 7 ยอดกระจุก

(ก) คือ กลุ่มยอดกระจุก

(ข) คือ ยอดจากยอดกระจุกที่นำมาตัดแบ่ง

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

การทดลองที่ 4.2 การตัดแบ่งโคนก้านใบ

วิธีการทดลอง

ใช้อาหารวุ้นสูตร MS (วิธีการเตรียมดูข้อ 5) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ 2,4-D 0.05 มก/ล โดยเตรียมใส่หลอดทดลองขนาด 25x150 มม ปริมาตรหลอดละ 10 มล

ตัดโคนก้านใบขนาด 10 มม นำมาผ่าตามกรรมวิธีต่างๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไม่ผ่า

กรรมวิธีที่ 2 ผ่าครึ่งตามยาว

กรรมวิธีที่ 3 ผ่าสี่ส่วนตามยาว

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์รวม 3 กรรมวิธี โดยแต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ ดังนี้

การบันทึกผล

1. บันทึกการเจริญเติบโตของต้นดังนี้
   1.1 จำนวนวันเฉลี่ยเมื่อเริ่มเกิดยอด
   1.2 จำนวนยอดเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง
   1.3 จำนวนต้นเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง
2. บันทึกการเจริญของรากดังนี้
   2.1 เปอร์เซ็นต์การเกิดราก
   2.2 จำนวนวันเฉลี่ยเมื่อเริ่มเกิดราก
   2.3 ลักษณะอื่นๆ เช่น ความผิดปกติของราก สี และขนาด

6.5 การทดลองที่ 5 ผลของขนาดและตำแหน่งของรากใหญ่ต่อการพัฒนาเป็นต้นใหม่

วิธีการทดลอง

ใช้อาหารวุ้นสูตร MS (วิธีการเตรียมดูข้อ 5) โดยเตรียมใส่หลอดทดลองขนาด 25x150 มม ปริมาตรหลอดละ 10 มล

ตัดชิ้นส่วนรากขนาดใหญ่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มม ตามขวางให้มีความยาว 5 มม เพื่อใช้ในทั้ง 2 การทดลองย่อย

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ แต่ละกรรมวิธีมี 6 ซ้ำ โดยแบ่งเป็น 2 การทดลองย่อยดังนี้

การทดลองที่ 5.1 ผลของตำแหน่งและความยาวราก 2 ขนาด

การทดลองนี้มีทั้งหมด 10 กรรมวิธี ดังนี้

ตารางที่ 12 กรรมวิธีในการทดลองที่ 5.1

ตำแหน่งจากปลายราก	ความยาวราก (มม)	
	30	40
1	T1	T6
2	T2	T7
3	T3	T8
4	T4	T9
5	T5	T10

การบันทึกผล

บันทึกการเจริญเติบโตของต้นดังนี้ คือจำนวนต้นเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง และเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นใหม่

การทดลองที่ 5.2 ผลของความยาวและตำแหน่งจากชิ้นส่วนปลายราก

การทดลองนี้มีทั้งหมด 10 กรรมวิธี ดังนี้

ตารางที่ 13 กรรมวิธีในการทดลองที่ 5.2

ความยาวราก (มม)	ตำแหน่งจากปลายราก	
	1	2
10	T1	T2
20	T3	T4
30	T5	T6
40	T7	T8
50	T9	T10

การบันทึกผล

บันทึกการเจริญเติบโตของต้นดังนี้ คือจำนวนต้นเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง และเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University