บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 เมล็ดน้อยหน่าพันธุ์ฝ่าย

1.2 ตู้กรองอากาศบริสุทธิ์ (laminar air flow)

1.3 ตะแกรงสำหรับวางหลอดที่เลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 40 หลอด

1.4 ชั้นสำหรับวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีระบบให้แสงฟลูออเรสเซนส์ขนาด 36 วัตต์ จำนวน 3 หลอด/ชั้น

1.5 เครื่องชั่งชนิดละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

1.6 เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 3 ตำแหน่ง

1.7 เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง

1.8 เตาไมโครเวฟ

1.9 หม้อนึ่งความดันไอ

1.10 กล้องจุลทรรศน์

1.11 หลอดทดลองขนาด 25 × 150 มม

1.12 ช้อนตักสาร

1.13 ขวดรูปชมพู่ (erlenmayer flask) ขนาด 125 และ 250 มล

1.14 ขวดปรับปริมาตร ขนาด 100, 500 และ 1,000 มล

1.15 ขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.16 ปิเปต ขนาด 1, 2, 5, 10, 25 และ 50 มล

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

1.18 กระบอกวัดปริมาตรขนาด 10, 50 และ 100 มล

1.19 แท่งแก้วสำหรับคนสาร

1.20 จานเลี้ยงเชื้อ (petri - dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 95 และ 140 มม

1.21 ขวดใส่สารละลายเข้มข้น ปริมาตร 1,000 มล

1.22 วัสดุที่ใช้ในตู้กรองอากาศ ได้แก่

1.22.1 ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.22.2 ปากคีบขนาดยาว 140 และ 180 มม

1.22.3 ด้ามเข็มเขี่ย

1.22.4 ใบมีดโกนที่ตัดเป็นใบมีดขนาด 2 × 10 มม

1.22.5 แท่งทองเหลืองสำหรับเสียบด้ามเข็มเขี่ยและวางปากคีบ

1.22.6 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 3

1.22.7 แผ่นพลาสติกใสขนาด 70 × 90 มม

1.22.8 หลอดทดลองใส่แอลกอฮอล์ขนาด 25 × 150 มม

1.23 วัสดุอื่นๆ เช่น แผ่นอลูมินัม (aluminun foil) ยางรัดของ กระดาษกาวเขียนกรรมวิธีติดหลอดทดลอง ฯลฯ

1.24 น้ำกลั่นซึ่งกลั่นจากเครื่องแก้ว

2. สารเคมี

2.1 สารที่ใช้ทำความสะอาดเชื้อ

2.1.1 Ethanol เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์

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

2.1.3 สารจับใบ Tween 20 ของบริษัทสากลเคมีภัณฑ์และการค้าจำกัด

2.2 สารที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

2.2.1 เกลือให้ธาตุอาหารหลักต่างๆสูตร White (1963)

2.2.2 เกลือให้ธาตุอาหารหลักต่างๆสูตร SH (1962)

2.2.3 เกลือให้ธาตุอาหารหลักต่างๆสูตร VW (1949)

2.2.4 เกลือให้ธาตุอาหารรองต่างๆสูตร MS (1962)

2.2.5 วิตามินต่างๆสูตร MS (1962)

2.2.6 Ferrous sulfate ของบริษัท J.T. Baker Chemical Co., Philipsburg N.J., U.S.A.

2.2.7 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

2.2.7.1 Benzyl aminopurine (BAP) ของบริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.

2.2.7.2 Indole butyric acitic (IBA) ของบริษัท E. Merck, Darmstadt West Germany

2.2.7.3 6-Furfuryl aminopurine (Kinetin) ของบริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.

2.2.7.4 GA_3 (Gibberellic acid) ของบริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.

2.2.8 น้ำมะพร้าว

2.2.9 น้ำกลั่น

2.2.10 Potassium hydroxide (KOH) 1 N

2.2.11 Hydrochloric acid (HCL) 1 N

2.2.12 ผงวุ้นตราเฮลิคอปเตอร์

2.2.13 น้ำตาลซูโครส

2.3 สารที่ใช้ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

2.3.1 Ethanol ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์

2.3.2 Glacial acetic acid

2.3.3 Formalin

2.3.4 TBA

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. การเตรียมพืชทดลอง

3.1 การเตรียมต้นกล้าน้อยหน่าเพื่อใช้ในการทดลองที่ 1

เตรียมเมล็ดน้อยหน่าพันธุ์ฝ้าย โดยแกะเมล็ดจากผลน้อยหน่าสด ล้างเมล็ดให้สะอาดไม่ให้มีเนื้อติดด้วยน้ำที่ไหลตลอดเวลา วางผึ่งเมล็ดที่ล้างแล้วในที่สะอาด อากาศถ่ายเทสะดวกและคลุมเมล็ดด้วยผ้าขาวบางเพื่อกันฝุ่นละออง ทิ้งไว้ให้เมล็ดแห้ง แกะเยื่อหุ้มเมล็ดออก แล้วทำการฆ่าเชื้อที่ผิว

เมล็ดโดยการนำมาแช่ในน้ำยา Clorox ที่มีความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เติม Tween 20 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นจึงนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น ที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง โดยทำในตู้ปลอดเชื้อ

เตรียมต้นกล้าน้อยหน่า โดยนำเมล็ดน้อยหน่าที่แกะเยื่อหุ้มเมล็ดและฆ่าเชื้อแล้วไปเพาะบนอาหารสูตร White (1963) โดยเพาะ 1 เมล็ดต่อ 1 หลอดทดลอง นำไปเลี้ยงไว้ในที่มืดอุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จนเกิดต้นกล้าที่มีความยาว 7 ซม จึงนำไปทำการทดลองต่อไป

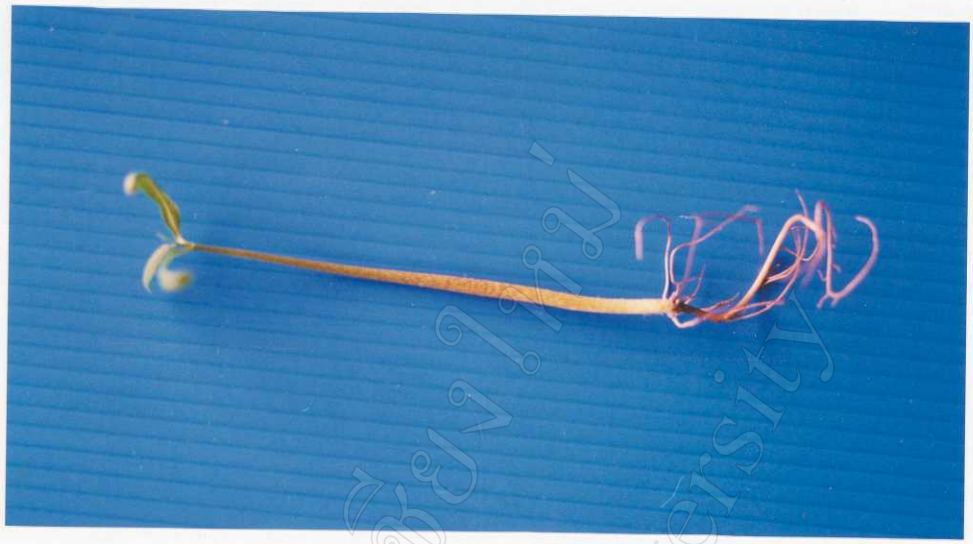
ก. ข.

ภาพ 1 เมล็ดน้อยหน่า

ก) เมล็ดน้อยหน่าปรกติ

ข) เมล็ดน้อยหน่าที่เอาเปลือกหุ้มเมล็ดออก

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



ภาพ 2 ต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดอายุ 1 สัปดาห์

3.2 การเตรียมยอดอ่อนน้อยหน่าเพื่อใช้ในการทดลองที่ 2 และ 3

ใช้เนื้อเยื่อของลำต้นส่วนใต้ใบเลี้ยงโดยใช้ส่วนปลายขนาด 1 มม (จากผลการทดลองที่ 1) ไปเลี้ยงบนอาหารสูตร SH ที่มี BAP 8 มก/ล ในหลอดทดลองขนาด 25 × 150 มม โดยสภาพการเลี้ยงเริ่มแรกนี้มีความเข้มแสงประมาณ 1,500 ลักส์ (lux) ให้แสง 24 ชม/วัน อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เลี้ยงจนเกิดยอดอ่อนอายุ 2 สัปดาห์จึงนำไปทำการทดลองต่อไป

ภาพ 3 ยอดอ่อนที่เกิดจากการเลี้ยงลำต้นส่วนใต้ใบเลี้ยง หลังการเลี้ยง 2 สัปดาห์

4 การเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution)

4.1 การเตรียมธาตุอาหารหลัก

4.1.1 การเตรียมธาตุอาหารหลักสูตร White (1963)

เตรียมธาตุอาหารหลักสูตร White ความเข้มข้น 10X โดยชั่งสารแต่ละชนิดในตาราง 2 ละลายสารแต่ละชนิดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตร (volumetic flask) ขนาด 1,000 มล แล้วเทใส่ขวดเก็บสารละลายเข้มข้น ปิดฝา เขย่าให้เข้ากัน จึงเก็บในตู้เย็น

ตาราง 2 ชนิดและปริมาณสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร White (1963)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร White (1963) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาเข้มข้น 10X (มก/ล)
KCl	65.0	650
$MgSO_4.7H_2O$	720.0	7,200
$NaH_2PO_4.H_2O$	16.5	165
KNO_3	80.0	800
Na_2SO_4	200.0	2,000
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	300.0	3,000

4.1.2 การเตรียมธาตุอาหารหลักสูตร SH (1972)

เตรียมธาตุอาหารหลักสูตร SH ความเข้มข้น 10X โดยชั่งสารแต่ละชนิดในตาราง 3 ละลายสารแต่ละชนิดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 1,000 มล แล้วเทใส่ขวดเก็บสารละลายเข้มข้นปิดฝา เก็บในตู้เย็น

ตาราง 3 ชนิดและปริมาณสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร SH (1972)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร SH (1972) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาเข้มข้น 10X (มก/ล)
KNO_3	2,500	25,000
$MgSO_4.7H_2O$	400	4,000
$(NH_4)H_2PO_4$	300	3,000
$CaCl_2.2H_2O$	200	2,000

4.1.3 การเตรียมธาตุอาหารหลักสูตร VW (1949)

เตรียมธาตุอาหารรองสูตร VW ความเข้มข้น 10X โดยชั่งสารแต่ละชนิดในตาราง 4 ละลายสารแต่ละชนิดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 1,000 มล แล้วเทใส่ขวดเก็บสารละลายเข้มข้น ปิดฝา เก็บในตู้เย็น

ตาราง 4 ชนิดและปริมาณสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร VW (1949)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร VW (1949) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาเข้มข้น 10X (มก/ล)
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	151.5	1,515
KNO_3	524.7	5,247
KH_2PO_4	250.4	2,504
$MgSO_4.7H_2O$	248.9	2,489
$(NH_4)_2SO_4$	499.4	4,994

4.2 การเตรียมธาตุอาหารรองสูตร MS (1962)

เตรียมธาตุอาหารรองสูตร MS โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน โดยให้ความเข้มข้นของสารเป็น 10X ของสารละลายมาตรฐาน โดยเตรียมให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล (ตาราง 5)

ตาราง 5 ชนิดและปริมาณของสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรองสูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาเข้มข้น 100X (มก/ล)
$CuSo_4.5H_2O$	0.025	2.5
KI	0.830	83.0
$ZnSO_4.7H_2O$	8.600	860.0
$MnSO_4.4H_2O$	22.300	2230.0
H_3BO_3	6.200	620.0
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.250	25.0
$CoCl_2.6H_2O$	0.250	2.5

4.3 การเตรียมสารอินทรีย์สูตร MS (1962) ดัดแปลง

เตรียมวิตามินสูตร MS ดัดแปลง โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน โดยให้ความเข้มข้นของสารเป็น 100X ของความเข้มข้นมาตรฐาน เตรียมให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล (ตาราง 6)

ตาราง 6 ชนิดและปริมาณของสารในสารละลายเข้มข้นของสารอินทรีย์สูตร MS (1962) ดัดแปลง

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาเข้มข้น 100X (มก/ล)
glycine	2.00	200
myo-inositol	100.00	10,000
thiamine.HCl	0.25	25
pyridoxin.HCl	0.25	25
nicotinic acid	0.25	25

4.4 การเตรียมสารละลายเหล็กในรูป FeEDTA

เตรียม FeEDTA ในสูตร MS (1962) ซึ่งประกอบไปด้วย $FeSO_4.7H_2O$ และ $Na_2EDTA.2H_2O$ โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน ปริมาณสารเข้มข้นเป็น 100X โดยชั่งสารแต่ละชนิดตามกำหนด ละลายในน้ำให้มีปริมาตรสุดท้ายของแต่ละส่วน 500 มล (ตาราง 7) การละลายสารกระทำในสภาพที่มีแสงน้อยที่สุด แล้วนำสารละลายทั้งสองมาผสมรวมกันในขวดเดียวกัน และเก็บสารละลายในที่มืดโดยใช้ขวดสีชาเพื่อป้องกันแสง

ตาราง 7 ชนิดและปริมาณของสารละลายเหล็กเข้มข้นสูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาเข้มข้น100X (ก/ล)
$FeSO_4.7H_2O$	27.80	2.78
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.30	3.73

4.5 การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต

4.5.1 การเตรียม BAP

ชั่ง BAP 50 มก ละลายด้วยสารละลาย KOH 1 N เล็กน้อยสำหรับให้ละลายได้หมดแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นจริงดูรายละเอียดจากแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในการทดลอง

4.5.2 การเตรียม kinetin

ชั่ง kinetin 10 มก ละลายด้วยสารละลาย KOH 1 N เล็กน้อยสำหรับให้ละลายได้หมดแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นจริงดูรายละเอียดจากแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในการทดลอง

4.5.3 การเตรียม IBA

ชั่ง IBA 10 มก ละลายด้วย absolute ethanol เล็กน้อยสำหรับให้ละลายได้หมดแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นจริงดูรายละเอียดจากแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในการทดลอง

4.5.4 การเตรียม GA_3

ชั่ง GA_3 10 มก ละลายด้วย absolute ethanol เล็กน้อยสำหรับให้ละลายได้หมด แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นจริงดูรายละเอียดจากแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในการทดลอง

5 การเตรียมอาหารพื้นฐาน

ใส่น้ำกลั่นลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มล ประมาณ 1/3 ของขวด แล้วเติมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักแต่ละชนิดลงไป โดยเขย่าขวดให้น้ำยาผสมกันดีในแต่ละครั้งที่เติม แล้วเพิ่มน้ำกลั่นลงไปอีกเพื่อกันการตกตะกอนก่อนที่จะเติมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรอง สารอินทรีย์ เหล็ก และสารควบคุมการเจริญเติบโตลงไปตามลำดับ แล้วจึงเติมน้ำมะพร้าว น้ำตาล และน้ำกลั่นลงไปอีกจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล (ตาราง 8) เทสารละลายลงในบีกเกอร์ ขนาด 2,000 มล นำไปปรับค่าความเป็นกรดให้ได้ 5.7 โดยใช้ HCl 1 N หรือ KOH 1 N ในการเตรียมอาหารแข็งใส่ผงวุ้นลงไปในสารละลายแล้วนำไปต้มจนวุ้นละลาย ตวงแบ่งอาหารใส่หลอดทดลองขนาด 25 × 150 มม หลอดละ 10 มล ปิดหุ้มหลอดทดลองด้วยแผ่นพลาสติกใสทนร้อนขนาด 70 × 90 มม รัดด้วยยางรัด และรัดรวมกัน 5 หลอด และหุ้มทับด้วยกระดาษลอกลายขนาด 120 × 120 มม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 15 ป/น^2 (ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) นาน 15 นาที

ตาราง 8 ส่วนประกอบของสารละลายเข้มข้นแต่ละชนิดในอาหารพื้นฐานสูตร White, SH และ VW

ชนิดของสารละลาย	ปริมาณสารละลายเข้มข้นในอาหาร 1 ลิตร (มล/ล)		
	White (1963)	SH (1972)	VW (1949)
สารละลายธาตุอาหารหลักความเข้มข้น 10X	100	100	100
สารละลายธาตุอาหารรองสูตร MS (1962) ความเข้มข้น 100X	10	10	10
สารละลายสารอินทรีย์สูตร MS (1962) ความเข้มข้น 100X	10	10	10
สารละลายเหล็กสูตร MS (1962) ความเข้มข้น 100X	10	10	10
สารควบคุมการเจริญเติบโต			
BAP (50 มก ในน้ำยา 100 มล)	*	*	*
IBA (10 มก ในน้ำยา 100 มล)	*	*	*
GA_3 (10 มก ในน้ำยา 100 มล)	*	*	*
kinetin (10 มก ในน้ำยา 100 มล)	*	*	*
น้ำมะพร้าว (มล/ล)	-	200	-
น้ำตาลซูโครส (ก/ล)	30	30	30
วุ้น(ก/ล)	8	8	8

หมายเหตุ * ปริมาณที่ใช้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นในแต่ละกรรมวิธี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ตาราง 9 ปริมาณสารเร่งการเจริญเติบโตในแต่ละกรรมวิธี

ชนิด	ความเข้มข้นในแต่ละกรรมวิธี (มก/ล)	ปริมาณที่ใช้ 100 มล	หมายเหตุ
BAP	0.0	0.0	จากน้ำยาเข้มข้น 50 มก/
	0.5	0.1	100 มล
	1.0	0.2	
	2.0	0.4	
	4.0	0.8	
	8.0	1.6	
IBA	0.0	0.0	จากน้ำยาเข้มข้น 10 มก/
	1.0	1.0	100 มล
	3.0	3.0	
	5.0	5.0	
GA_3	0.0	0.0	จากน้ำยาเข้มข้น 10 มก/
	0.3	0.3	100 มล
kinetin	0.0	0.0	จากน้ำยาเข้มข้น 10 มก/
	0.5	0.5	100 มล
	1.0	1.0	
	5.0	5.0	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

6. วิธีการวิจัย

6.1 การทดลองที่ 1 การหาชิ้นส่วนที่เหมาะสมสำหรับการเกิดยอดจากชิ้นส่วนของต้นกล้า

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อยดังนี้

การทดลองที่ 1.1 การหาขนาดที่เหมาะสมสำหรับการเริ่มต้นเลี้ยง (initial culture)

<u>พืชทดลอง</u>

ใช้ชิ้นส่วนลำต้นส่วนใต้ใบเลี้ยง ที่ได้จากการเพาะเมล็ดในอาหารสูตร White ในสภาพปลอดเชื้อ (วิธีเตรียมดูข้อ 3.1)

<u>อาหาร</u>

ใช้อาหารวุ้นสูตร SH (วิธีการเตรียมดูข้อ 5) โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต คือ BAP 8.0 มก/ล โดยเตรียมใส่หลอดทดลองขนาด 25 × 150 มม หลอดละ 10 มล

<u>วิธีการทดลอง</u>

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) โดย 2 ปัจจัย คือ ตำแหน่งของลำต้นส่วนใต้ใบเลี้ยง 3 ตำแหน่งและ ขนาด 7 ขนาด รวมเป็น 21 กรรมวิธี โดยทดลอง 10 ซ้ำในแต่ละกรรมวิธี (ตาราง 10) ดังนี้

1. ตำแหน่ง แบ่งเป็น 3 ตำแหน่ง คือ ส่วนโคน (ติดกับราก) ส่วนกลาง และส่วนปลาย (ติดกับใบเลี้ยง)
2. ขนาด แบ่งเป็น 7 ขนาด คือ < 0.50, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50 และ 15.00 มม (ขนาดใช้โดย Lemon and Blake, 1996)

<u>การบันทึกผล</u>

ทำการบันทึกผลการทดลองทุกสัปดาห์ ติดต่อกันนาน 8 สัปดาห์ดังนี้

1. จำนวนวันเฉลี่ยที่เริ่มเกิดยอด
2. จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืช
3. เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด
4. ศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาดูการพัฒนาของตายอดโดยตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 13 ไมครอน

ตาราง 10 แสดงกรรมวิธีในการทดลองที่ 1.1

ตำแหน่ง ขนาด (มม)	โคน	กลาง	ปลาย
< 0.50	กรรมวิธี 1	8	15
0.50	2	9	16
1.00	3	10	17
1.50	4	11	18
2.00	5	12	19
2.50	6	13	20
15.00	7	14	21

การทดลองที่ 1.2 การเปรียบเทียบตำแหน่งข้อ ตำแหน่งปล้อง กับลำต้นส่วนใต้ใบเลี้ยง

<u>พืชทดลอง</u>

ใช้ชิ้นส่วนลำต้นส่วนใต้ใบเลี้ยง ที่ได้จากการเพาะเมล็ดในอาหารสูตร White ในสภาพปลอดเชื้อ (วิธีเตรียมดูข้อ 3)

<u>อาหาร</u>

ใช้อาหารวุ้นสูตร SH ที่เติม BAP 8.0 มก/ล โดยเตรียมใส่หลอดทดลองขนาด 25 × 150 มม หลอดละ 10 มล

<u>วิธีการทดลอง</u>

ชิ้นส่วนพืชในการทดลอง ใช้ส่วนข้อและปล้อง เทียบกับส่วนปลายของลำต้นจากส่วนใต้ใบเลี้ยง วางการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์รวม 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ลำต้นส่วนใต้ใบเลี้ยง

กรรมวิธีที่ 2 ข้อที่ 1

กรรมวิธีที่ 3 ปล้องที่ 1

กรรมวิธีที่ 4 ข้อที่ 2

กรรมวิธีที่ 5 ปล้องที่ 2

การบันทึกผล

ทำการบันทึกผลการทดลองทุกสัปดาห์ ติดต่อกันนาน 8 สัปดาห์ดังนี้

1. จำนวนวันเฉลี่ยที่เริ่มเกิดยอด
2. จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืช
3. เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด

6.2. การทดลองที่ 2 ผลของสารกระตุ้นการเจริญเติบโตต่อการเจริญของยอดที่เกิดจากการเลี้ยงลำต้นส่วนใต้ใบเลี้ยง ในสภาพปลอดเชื้อ

แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลองย่อยดังนี้

การทดลองที่ 2.1 ผลของระดับ BAP และ IBA ต่อการเจริญของยอดอ่อน

พืชทดลอง

นำเนื้อเยื่อลำต้นส่วนใต้ใบเลี้ยงตามขนาด และตำแหน่งเหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 1 ไปเลี้ยงบนอาหาร สูตร SH ที่มี BAP 8.0 มก/ล จนเกิดยอดอ่อนอายุ 2 สัปดาห์จึงนำไปทำการทดลองต่อไป (วิธีการเตรียมดูข้อ 3.2)

อาหาร

ใช้อาหารวุ้นสูตร SH ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด คือ BAP และ IBA โดยปรับระดับ BAP อยู่ในช่วง 0.0 – 8.0 มก/ล ส่วน IBA อยู่ในช่วง 0.0 - 0.3 มก/ล โดยเตรียมใส่หลอดทดลองขนาด 25 × 150 มม หลอดละ 10 มล

วิธีการทดลอง

การทดลองประกอบด้วย BAP 6 ระดับ คือ 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 และ 8.0 มก/ล และ IBA 2 ระดับคือ 0.0 และ 0.3 มก/ล วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ รวมเป็น 12 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ (ตาราง 11)

การบันทึกผล

ทำการบันทึกผลการทดลองเมื่อสิ้นสุดการทดลอง โดยทำการบันทึกการเจริญของยอดอ่อนดังนี้

1. ความสูงของต้น
2. ความยาวข้อ
3. จำนวนใบ
4. ความกว้างและความยาวของใบ

5. ศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาของใบที่เกิดอาการผิดปรกติโดยตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 13 ไมครอน

ตาราง 11 แสดงกรรมวิธีในการทดลองที่ 2.1

IBA (มก/ล) / BAP (มก/ล)	0.0	0.3
0.0	กรรมวิธี 1	7
0.5	2	8
1.0	3	9
2.0	4	10
4.0	5	11
8.0	6	12

การทดลองที่ 2.2 ผลของระดับ IBA และ kinetin ต่อการเจริญของยอดอ่อน

<u>พืชทดลอง</u>

ใช้พืชทดลองเหมือนการทดลองที่ 2.1 (วิธีการเตรียมดูข้อ 3.2)

<u>อาหาร</u>

ใช้อาหารวุ้นสูตร SH ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด คือ IBA และ kinetin โดยปรับระดับ IBA อยู่ในช่วง 0.0 - 0.3 มก/ล ส่วน kinetin อยู่ในช่วง 0.0 – 5.0 มก/ล โดยเตรียมใส่หลอดทดลองขนาด 25 × 150 มม หลอดละ 10 มล

<u>วิธีการทดลอง</u>

การทดลองประกอบด้วย IBA 2 ระดับคือ 0.0 และ 0.3 มก/ล และ kinetin 4 ระดับคือ 0.0, 1.0, 3.0 และ 5.0 มก/ล วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ รวมเป็น 8 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ (ตาราง 12)

ตาราง 12 แสดงกรรมวิธีในการทดลองที่ 2.2

IBA (มก/ล) / kinetin (มก/ล)	0.0	0.3
0.0	กรรมวิธี 1	5
1.0	2	6
3.0	3	7
5.0	4	8

<u>การบันทึกผล</u>

บันทึกการเจริญเติบโตของต้นเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1

การทดลองที่ 2.3 ผลของระดับ BAP และ GA_3 ต่อการเจริญของยอดอ่อน

<u>พืชทดลอง</u>

ใช้พืชทดลองเหมือนการทดลองที่ 2.1 (วิธีการเตรียมดูข้อ 3.2)

<u>อาหาร</u>

ใช้อาหารวุ้นสูตร SH ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด คือ BAP และ GA_3 โดยปรับระดับ BAP อยู่ในช่วง 0.0 – 8.0 มก/ล ส่วน GA_3 อยู่ในช่วง 0.0 – 5.0 มก/ล โดยเตรียมใส่หลอดทดลองขนาด 25 × 150 มม หลอดละ 10 มล

<u>วิธีการทดลอง</u>

การทดลองประกอบด้วย BAP 5 ระดับคือ 0.0, 1.0, 2.0, 4.0 และ 8.0 มก/ล และ GA_3 4 ระดับ คือ 0.0, 0.5, 1.0 และ 5.0 มก/ล วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ รวมเป็น 20 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ (ตาราง 13)

<u>การบันทึกผล</u>

บันทึกการเจริญเติบโตของต้นเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1

ตาราง 13 แสดงกรรมวิธีในการทดลองที่ 2.3

GA_3 (มก/ล) BAP (มก/ล)	0.0	0.5	1.0	5.0
0.0	กรรมวิธี 1	6	11	16
1.0	2	7	12	17
2.0	3	8	13	18
4.0	4	9	14	19
8.0	5	10	15	20

6.3 การทดลองที่ 3 ผลของส่วนประกอบอาหารต่อการเจริญเติบโตของยอดอ่อน

แบ่งการทดลองเป็น 3 การทดลองย่อยดังนี้

การทดลองที่ 3.1 การหาระดับน้ำมะพร้าวที่เหมาะสมต่อการเจริญของยอดอ่อน

พืชทดลอง

ใช้พืชทดลองเหมือนการทดลองที่ 2.1 (วิธีการเตรียมดูข้อ 3.2)

อาหาร

ใช้อาหารวุ้นสูตร SH ที่เติม BAP 8.0 มก/ล และมีน้ำมะพร้าวต่างกัน 5 ระดับ โดยเตรียมใส่หลอดทดลองขนาด 25 × 150 มม หลอดละ 10 มล

วิธีการทดลอง

การทดลองประกอบด้วยน้ำมะพร้าว 5 ระดับ คือ 0, 10, 20, 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ เป็น 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 น้ำมะพร้าว 0 เปอร์เซ็นต์
กรรมวิธีที่ 2 น้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์
กรรมวิธีที่ 3 น้ำมะพร้าว 20 เปอร์เซ็นต์
กรรมวิธีที่ 4 น้ำมะพร้าว 30 เปอร์เซ็นต์
กรรมวิธีที่ 5 น้ำมะพร้าว 40 เปอร์เซ็นต์

การบันทึกผล

บันทึกการเจริญเติบโตของต้นเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1

การทดลองที่ 3.2 ผลของ L-Glutamine ที่มีต่อการเจริญของยอดอ่อน

พืชทดลอง

ใช้พืชทดลองเหมือนการทดลองที่ 2.1 (วิธีการเตรียมดูข้อ 3.2)

อาหาร

ใช้อาหารวุ้นสูตร SH ที่เติม BAP 8.0 มก/ล และมี L-Glutamine ต่างกัน 6 ระดับ โดยเตรียมใส่หลอดทดลองขนาด 25×150 มม หลอดละ 10 มล

วิธีการทดลอง

การทดลองประกอบด้วย L- Glutamine 6 ระดับคือ 0, 25, 50, 100, 150 และ 200 มก/ล วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ รวมเป็น 6 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 L- Glutamine 0 มก/ล
กรรมวิธีที่ 2 L- Glutamine 25 มก/ล
กรรมวิธีที่ 3 L- Glutamine 50 มก/ล
กรรมวิธีที่ 4 L- Glutamine 100 มก/ล
กรรมวิธีที่ 5 L- Glutamine 150 มก/ล
กรรมวิธีที่ 6 L- Glutamine 200 มก/ล

การบันทึกผล

บันทึกการเจริญเติบโตของต้นเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1

การทดลองที่ 3.3 ผลของความเข้มข้นของเกลือ และน้ำตาลที่มีต่อการเจริญของยอดอ่อน

พืชทดลอง

ใช้พืชทดลองเหมือนการทดลองที่ 2.1 (วิธีการเตรียมดูข้อ 3.2)

อาหาร

ใช้อาหารวุ้น 3 สูตร คือ ½SH, SH และ VW และน้ำตาลต่างกัน 3 ระดับ และเติม BAP 8.0 มก/ล โดยเตรียมใส่หลอดทดลองขนาด 25 × 150 มม หลอดละ 10 มล

วิธีการทดลอง

การทดลองประกอบด้วยอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือ 3 ระดับ คือ ½SH, SH และ VW ร่วมกับน้ำตาล 3 ระดับ คือ 3, 2 และ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยวางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ รวมเป็น 9 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ (ตาราง 14)

ตาราง 14 แสดงกรรมวิธีในการทดลองที่ 3.3

สูตรอาหาร / น้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)	½SH	SH	VW
1	กรรมวิธี 1	4	7
2	2	5	8
3	3	6	9

<u>การบันทึกผล</u>

บันทึกการเจริญเติบโตของต้นเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University