บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การดำเนินการศึกษามี 3 ขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับวิธีการขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด ขั้นตอนที่สองการขยายพันธุ์โดยการปักชำ และขั้นตอนที่สามศึกษาการเจริญเติบโตของต้นกล้า ที่ย้ายจากสภาพปลอดเชื้อออกปลูกในสภาพธรรมชาติ

3.1 การขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด

ก. อุปกรณ์และสารเคมี

1) ผลตะไคร้ต้นในระยะพัฒนาการต่างๆ
2) กรรไกรตัดกิ่ง
3) เวอร์เนียคาลิเปอร์ ไม้บรรทัด
4) ถุงพลาสติกใส ถุงมือผ่าตัด ป้ายชื่อ ยางรัด
5) ตะกร้าเพาะปลูก
6) สารควบคุมการเจริญเติบโตได้แก่ GA_3
7) สารป้องกันและกำจัดเชื้อราได้แก่ เบนเลต

3.1.1 สัณฐานวิทยาของเมล็ด

นำผลสด ผลกึ่งอ่อนกึ่งแก่ ผลแก่จัด จากสวนป่า ขององค์การสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ จังหวัดเชียงใหม่ ที่เก็บได้ในช่วงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2542 มาศึกษาลักษณะต่างๆ ของผล สังเกตและบันทึกภาพทั้งผล ซึ่งประกอบด้วยเปลือก เนื้อผล เปลือกหุ้มเมล็ด และเมล็ด จากตัวอย่างผลจำนวน 100 ผล

บันทึกผล : ส่วนประกอบต่างๆ ของผลและเมล็ด

3.1.2 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด

ศึกษาเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดที่นำมาจากผลที่แก่จัด(เนื้อผลมีสีดำ) ปอกเนื้อผลออก คัดเฉพาะเมล็ดที่จมน้ำ และผึ่งในที่ร่ม 1 วัน ก่อนนำมาเพาะในวัสดุปลูกที่มีสัดส่วนผสมของดิน : ทราย : แกลบดำ เท่ากับ 1 : 1 : 1 โดยปริมาตร จำนวน 100 เมล็ด ลงในวัสดุปลูกกลบเมล็ดให้

ลึกประมาณ 0.5 เซนติเมตร รดน้ำสม่ำเสมอ นำมาไว้ที่โรงพลาสติกที่สภาพปิด ที่มีความเข้มของแสงรำไรด้วยตาข่ายพรางแสง 70 เปอร์เซ็นต์ ทำการเพาะเมล็ดในช่วงฤดูฝน ต้นเดือนกรกฎาคมถึงปลายเดือนกันยายน พ.ศ. 2542 ทำซ้ำจำนวน 2 ครั้ง

บันทึก : เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ด

3.1.3 ผลของ GA_3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการงอกของเมล็ด

มีตัวแปร 2 ปัจจัยคือ ปัจจัยที่ 1 ความแก่ของเมล็ด 2 ระดับ ได้แก่ เมล็ดที่ได้จากผลกึ่งอ่อนกึ่งแก่ และเมล็ดที่ได้จากผลแก่จัด และปัจจัยที่ 2 ความเข้มข้นของ GA_3 4 ระดับ คือ 0, 100, 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in Completely Randomized Design: CRD) รวม 8 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 25 ซ้ำ ซ้ำละ 1 เมล็ด โดยนำผลตะไคร้ต้นดังกล่าวมาแกะเอาเนื้อออกได้เมล็ด และตัดส่วนของเปลือกเมล็ดจนเห็นส่วนของใบเลี้ยง ทำการแช่ใน GA_3 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆนาน 1 คืน แล้วจึงนำเมล็ดมาเพาะในวัสดุปลูกที่เตรียมไว้ ซึ่งมีสัดส่วนผสมของ ดิน : ทราย : แกลบดำ เท่ากับ 1 : 1 : 1 โดยปริมาตร กลบเมล็ดลึกประมาณ 0.5 เซนติเมตร รดน้ำสม่ำเสมอ นำมาวางไว้ที่โรงพลาสติกในสภาพปิด และมีสภาพความเข้มของแสงรำไรภายใต้ตาข่ายพรางแสง 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทำการเพาะเมล็ดในช่วงฤดูฝน ต้นเดือนสิงหาคมถึงปลายเดือนตุลาคม พ.ศ. 2542 บันทึกข้อมูลทุกสัปดาห์

กรรมวิธีที่ 1 เมล็ดที่ได้จากผลกึ่งอ่อนกึ่งแก่ แช่น้ำกลั่น
กรรมวิธีที่ 2 เมล็ดที่ได้จากผลกึ่งอ่อนกึ่งแก่ แช่ GA_3 ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 3 เมล็ดที่ได้จากผลกึ่งอ่อนกึ่งแก่ แช่ GA_3 ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 4 เมล็ดที่ได้จากผลกึ่งอ่อนกึ่งแก่ แช่ GA_3 ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 5 เมล็ดที่ได้จากผลแก่จัด แช่น้ำกลั่น
กรรมวิธีที่ 6 เมล็ดที่ได้จากผลแก่จัด แช่ GA_3 ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 7 เมล็ดที่ได้จากผลแก่จัด แช่ GA_3 ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 8 เมล็ดที่ได้จากผลแก่จัด แช่ GA_3 ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร

บันทึกผล : เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ด และความสมบูรณ์ของต้นกล้าที่งอก

3.2 การขยายพันธุ์โดยไม่ใช้เพศ

3.2.1 ผลของ IBA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการปักชำกิ่งตะไคร้ต้น

เปรียบเทียบผลของ IBA ความเข้มข้นต่างๆ 4 ระดับ คือ 0, 1,000, 3,000 และ 8,000 มิลลิกรัมต่อลิตร วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design : CRD) รวม 4 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 กิ่ง ใช้เฉพาะกิ่งยอดขนาดยาว 15 เซนติเมตรโดยนำกิ่งยอดตะไคร้ต้นจากสวนป่า ขององค์การสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ ในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2542 มาปักชำ โดยการจุ่มโคนกิ่งยอดในสารละลาย IBA ความเข้มข้นต่างๆ นาน 30 วินาที แล้วปักชำในวัสดุปลูกที่มีสัดส่วนผสมของ ดิน : ทราย : แกลบดำ เท่ากับ 1: 1 : 1 โดยปริมาตร ปักชำกิ่งลึกประมาณ 8 เซนติเมตร รดน้ำสม่ำเสมอแก่วัสดุปลูก นำมาวางไว้ที่โรงพลาสติกในสภาพปิด และมีสภาพความเข้มของแสงรำไรภายใต้ตาข่ายพรางแสง 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทำการปักชำในช่วงต้นฤดูฝน ต้นเดือนมิถุนายนถึงปลายเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2542 สังเกตผลโดยเก็บข้อมูลทุกสัปดาห์

กรรมวิธีที่ 1 จุ่มใน IBA ความเข้มข้น 0 (น้ำกลั่น)
กรรมวิธีที่ 2 จุ่มใน IBA ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 3 จุ่มใน IBA ความเข้มข้น 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 4 จุ่มใน IBA ความเข้มข้น 8,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

บันทึกผล : ลักษณะการเกิดราก จำนวนราก

3.2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตะไคร้ต้น

ก. วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1) ตัวอย่างพืชทดลองได้แก่ ปลายยอดตะไคร้ต้น
2) ตู้ตัดเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ (air flow cabinet)
3) หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
4) เตาไมโครเวฟ
5) เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง
6) เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง (electrical balance)

7) หลอดทดลองเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร

8) ตะแกรงเหล็กใส่หลอดแก้ว

9) ขวดทดลองเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร และช้อนตักสาร กระดาษอลูมินัมฟอยล์ ยางรัดของ พลาสติกใส

10) เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ จานแก้ว กระบอกวัดปริมาตรขนาด 25, 50, 100, 1,000 มิลลิลิตร ปิเปตขนาด 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 มิลลิลิตรบีกเกอร์ขนาด 10, 25, 50, 100, 150, 250, 500, 1,000, 2,000 มิลลิลิตร ขวดวัดปริมาตรขนาด 50, 100, 250, 500, 1,000 มิลลิลิตร ขวดใส่สารละลายขนาด 250, 500, 1,000 มิลลิลิตร แท่งแก้วคนสารละลาย ฯลฯ

11) เครื่องมือที่ใช้ในการตัดเลี้ยงในตู้ปลอดเชื้อ ได้แก่ ตะเกียงแอลกอฮอล์ หลอดใส่แอลกอฮอล์ ปากคีบ ด้ามมีด ใบมีดขนาดเบอร์ 10 และ 11 กล่องเหล็กใส่เครื่องมือ จานแก้วพร้อมกระดาษกรองใส่แผ่นพลาสติกใสไว้สำหรับรองพืช

12) ตู้ incubator ที่ควบคุมปริมาณ CO_2 ได้

ข. สารเคมีต่างๆ

1) Ethanol ความเข้มข้น 95 และ 70 เปอร์เซ็นต์

2) Clorox (Sodium hypochlorite 5.25%) ของบริษัท Regular Bleach

3) Tween 20 สารจับใบของ บริษัท Merck- Schuchardt

4) ธาตุอาหารหลักตามสูตรของ Murashige and Skoog (1962)

5) ธาตุอาหารรองตามสูตรของ Murashige and Skoog (1962)

6) วิตามินต่างๆ ตามสูตรของ Murashige and Skoog (1962)

7) ผงวุ้น ตราเฮลิคอปเตอร์ ห้างหุ้นส่วน จำกัด ศรีอิศรา

8) น้ำตาลทรายขาว และน้ำกลั่น

9) 3-Indole butyric acid (IBA) ของ บริษัท FluKa Biochemika

10) Indole-3- acetic acid (IAA) ของบริษัท Merck. Darmstadt Germany

11) N^6-Benzyladenine (BA) ของบริษัท FluKa Biochemika

12) Hydrochloric acid (HCl) 1 N

13) Sodium hydroxide (NaOH) 1 N

การเตรียมอาหารสูตรเข้มข้น (stock solution)

การเตรียมธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรอง

เตรียมธาตุอาหารหลักธาตุอาหารรองที่ใช้ในสูตร MS (1962) โดยชั่งสารแต่ละชนิดตามตาราง

ตารางที่ 1 การเตรียมธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรองและวิตามินที่ใช้ในสูตร MS (1962)

Stock 1	สารเคมี	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มก./ล.)	ปริมาณสารในสูตรความเข้มข้น 10x (ก./ล.)
	NH_4NO_3	1,900	19.00
	KNO_3	1,650	16.50

Stock 2	สารเคมี	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มก./ล.)	ปริมาณสารในสูตรความเข้มข้น100x (ก./ล.)
	$MgSO_4.7H_2O$	370	37.00
	$MnSO_4.4H_2O$	22.30	2.230
	$ZnSO_4.7H_2O$	8.60	0.860
	$CuSO_4.5H_2O$	0.025	0.0025

Stock 3	สารเคมี	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มก./ล.)	ปริมาณสารในสูตรความเข้มข้น100x (ก./ล.)
	$CaCl_2.2H_2O$	440	44
	KI	0.83	0.083
	$CoCl_2.6H_2O$	0.025	0.0025

Stock 4	สารเคมี	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มก./ล.)	ปริมาณสารในสูตรความเข้มข้น100x (ก./ล.)
	KH_2PO_4	170	17
	H_3BO_3	6.2	0.62
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	0.025

Stock 5	สารเคมี	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มก./ล.)	ปริมาณสารในสูตรความเข้มข้น100x (ก./ล.)
	$FeSO_4.7H_2O$	27.85	2.785
	Na_2EDTA	37.25	3.725

Stock 6	สารเคมี	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มก./ล.)	ปริมาณสารในสูตรความเข้มข้น200x (ก./500 มล.)
	Glycine	2.0	0.40
	Nicotinic acid	0.5	0.10
	Pyridoxine-HCI	0.5	0.10
	Thiamine-HCI	0.1	0.02
	Myo-inositol	100	20

การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต

1. การเตรียม BA ชั่งสาร BA 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ละลายด้วยสารละลาย 1 N NaOH เล็กน้อย สำหรับให้ละลายแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยน้ำกลั่น
2. การเตรียม IBA ชั่งสาร IBA 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ละลายด้วยสารละลาย 1 N NaOH เล็กน้อย สำหรับให้ละลายแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยน้ำกลั่น
3. การเตรียม IAA ชั่งสาร IAA 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ละลายด้วยสารละลาย 1 N NaOH เล็กน้อย สำหรับให้ละลายแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยน้ำกลั่น

การเตรียมสารละลายเข้มข้นของอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962) จาก Stock ที่เตรียมไว้แล้วดังตารางข้างต้น

ตารางที่ 2 การเตรียมสารละลายเข้มข้นของอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962)

ชนิดสารละลาย stock ที่	ปริมาตรสารละลายเข้มข้นในอาหาร(มล./ล.)
Stock ที่ 1 (10 เท่า)	100
Stock ที่ 2 (100 เท่า)	10
Stock ที่ 3 (100 เท่า)	10
Stock ที่ 4 (100 เท่า)	10
Stock ที่ 5 (100 เท่า)	10
Stock ที่ 6 (200 เท่า)	5
สารควบคุมการเจริญเติบโต	
BA (100 มก./ล.)	*
IBA (100 มก./ล.)	*
IAA (100 มก./ล.)	*
น้ำตาลทราย	30.0 กรัม หรือ *
วุ้น	8.0 กรัม

* ปริมาณที่ใช้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นในแต่ละกรรมวิธีในการทดลอง

ดำเนินการทดลองเป็นหลายขั้นตอน เพื่อนำไปสู่การชักนำยอดและรากจากเนื้อเยื่อจากส่วนปลายกิ่งตะไคร้ต้น ที่เลี้ยงบนอาหารสูตรมาตรฐานของ Murashige and Skoog (1962) ที่ดัดแปลงตามแต่กรณี มีขั้นตอนการศึกษาดังต่อไปนี้

1) ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อ

เปรียบเทียบผลของคลอรอกซ์ความเข้มข้นต่างๆกัน 4 ระดับ ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 คลอรอกซ์ 10% ฟอกนาน 10 นาที ตามด้วยคลอรอกซ์ 5% ฟอกนาน 5 นาที

กรรมวิธีที่ 2 คลอรอกซ์ 15% ฟอกนาน 10 นาที ตามด้วยคลอรอกซ์ 5% ฟอกนาน 5 นาที

กรรมวิธีที่ 3 คลอรอกซ์ 20% ฟอกนาน 10 นาที ตามด้วยคลอรอกซ์ 5% ฟอกนาน 5 นาที

กรรมวิธีที่ 4 คลอรอกซ์ 20% ฟอกนาน 15 นาที

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) รวม 4 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 20 ซ้ำ โดยเตรียมอาหาร MS ใส่หลอดทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร หลอดละ 10 มิลลิลิตร นำปลายยอดจากสวนป่า ที่องค์การสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ ในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2543 นำเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดของตะไคร้ต้นไปฟอกด้วยคลอรอกซ์ฆ่าเชื้อโดยการเขย่าด้วยมือ ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงในอาหาร MS นาน 5 สัปดาห์ ภายในห้องเลี้ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ 23-25 องศาเซลเซียส และสภาพที่ได้รับความเข้มแสง3,000 ลักซ์ นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกข้อมูลทุกสัปดาห์

บันทึกผล : เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของจุลินทรีย์

2) การเปรียบเทียบสูตรอาหารและชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสม สำหรับการเลี้ยงเนื้อเยื่อ

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in Completely Randomized Design :CRD) โดยมีตัวแปร 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยแรกสูตรอาหารมี 2 ระดับได้แก่ สูตร1/2MS สูตร MS โดยเตรียมอาหารใส่ขวดทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร ขวดละ 20 มิลลิลิตร ปัจจัยที่สองคือชิ้นส่วนของตะไคร้ต้นมี 2 ระดับได้แก่ ลำต้น ปลายยอด รวม 4 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 20 ซ้ำ นำทั้งลำต้น, ปลายยอดจากสภาพปลอดเชื้อย้ายมาเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ โดยตัดลำต้น ปลายยอด ให้มีความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร โดยเลี้ยงภายในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 23-25 องศาเซลเซียส และในสภาพที่ได้รับความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ บันทึกข้อมูลทุกสัปดาห์

กรรมวิธีที่ 1 อาหารสูตร1/2MS และชิ้นส่วนลำต้น

กรรมวิธีที่ 2 อาหารสูตร1/2MS และชิ้นส่วนปลายยอด

กรรมวิธีที่ 3 อาหารสูตร MS และชิ้นส่วนลำต้น

กรรมวิธีที่ 4 อาหารสูตร MS และชิ้นส่วนปลายยอด

บันทึกผล : จำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนราก ความยาวราก จำนวนใบ ระดับสีของใบ ขนาดแคลลัสเฉลี่ยที่เกิดต่อชิ้นส่วน

3) ขั้นตอนการชักนำให้เกิดยอด

3.1 ผลของ BA ที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอด

ใช้ส่วนของปลายยอดจากสภาพปลอดเชื้อ มาตัดให้มีความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร นำมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS (1962) โดยเปรียบเทียบผลของ Benzyladenine(BA) ความเข้มข้นต่างๆ 4 ระดับ คือ 0, 0.5, 1.0, 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเตรียมอาหารใส่ขวดทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร ขวดละ 20 มิลลิลิตร วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) รวม 4 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 15 ซ้ำ ภายในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 23-25 องศาเซลเซียสและสภาพที่ได้รับความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกข้อมูลทุกสัปดาห์

กรรมวิธีที่ 1 BA ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 2 BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 3 BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 4 BA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

บันทึกผล : จำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนราก ความยาวราก จำนวนใบ ระดับสีของใบ ขนาดแคลลัสเฉลี่ยที่เกิดต่อชิ้นส่วนยอด

4) ขั้นตอนการชักนำให้เกิดราก

โดยการเปรียบเทียบผลของ Indole butyric acid (IBA) เมื่อเติมลงในอาหาร ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 1.0 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือเมื่อใช้วิธีจุ่มชิ้นส่วนของพืชใน IBA ความเข้มข้น3 ระดับ คือ 200 250 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือเมื่อเติมใน Indole acetic acid (IAA) ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 1.0 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือผลร่วมระหว่าง IAA และ BA โดยทำการศึกษาระดับความเข้มข้น IAA 3 ระดับคือ 0.05 0.10 และ 1.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้น BA 3 ระดับ คือ 0.2 0.4 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

4.1 ผลของ IBA และ IAA ที่มีต่อการชักนำให้เกิดราก

นำชิ้นส่วนพืชทดลองใช้ปลายยอดยาวประมาณ 2 เซนติเมตร เลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS (1962) ที่มี IBA ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 1.0 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือเมื่อเติมใน Indole acetic acid (IAA) ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 1.0 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเตรียมอาหารใส่ขวดทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร ขวดละ 20 มิลลิลิตร ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 23-25 องศาเซลเซียสและในสภาพที่ได้รับความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกข้อมูลทุกสัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) รวม 6 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 2 IBA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 3 IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 4 IAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 5 IAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 6 IAA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

บันทึกผล : จำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนราก ความยาวราก จำนวนใบ ระดับสีของใบ ขนาดแคลลัสเฉลี่ยที่เกิดต่อชิ้นส่วน

4.2 การศึกษาผลของ IBA ที่มีต่อการชักนำให้เกิดราก

ใช้ยอด (shootlet) ที่ได้จากการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำมาตัดยอดยาว 2 เซนติเมตร จุ่มใน IBA ที่มีความเข้มข้นต่างๆ นาน 15 วินาที แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS (1962) โดยเตรียมอาหารใส่ขวดทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร ขวดละ 20 มิลลิลิตร ภายในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 23-25 องศาเซลเซียสและสภาพที่ได้รับความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกข้อมูลทุกสัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) รวม 3 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 IBA ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 2 IBA ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 3 IBA ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร

บันทึกผล จำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนราก ความยาวราก จำนวนใบ ระดับสีของใบ ขนาดแคลลัสเฉลี่ยที่เกิดต่อชิ้นส่วน

4.3 การศึกษาผลของ IAA ร่วมกับ BA ที่มีต่อการชักนำให้เกิดราก

ใช้ยอด (shootlet) ที่ได้จากการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำมาตัดให้มีความยาว 2 เซนติเมตร นำมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS (1962) ที่เติม IAA ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่างๆ โดยเตรียมใส่ขวดทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร ขวดละ 20 มิลลิลิตร ภายในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 23-25 องศาเซลเซียสและในสภาพที่ได้รับความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกข้อมูลทุกสัปดาห์

ทำการทดลองตัวแปร 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยแรก IAA แบ่งเป็น 3 ระดับ คือ 0.05, 0.10 และ 1.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ปัจจัยที่สองคือ BA แบ่งเป็น 3 ระดับ คือ 0.2, 0.4 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in Completely Randomized Design: CRD) รวมทั้งสิ้น 9 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 IAA 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 2 IAA 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และBA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 3 IAA 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และBA 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 4 IAA 0.10 มิลลิกรัมต่อลิตร และBA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 5 IAA 0.10 มิลลิกรัมต่อลิตร และBA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 6 IAA 0.10 มิลลิกรัมต่อลิตร และBA 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 7 IAA 1.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และBA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 8 IAA 1.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และBA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 9 IAA 1.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และBA 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร

บันทึกผล : จำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนราก ความยาวราก จำนวนใบ ระดับสีของใบ ขนาดแคลลัสเฉลี่ยที่เกิดต่อชิ้นส่วน

5) ผลร่วมของการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลและการเพิ่ม CO_2เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยง

โดยวิธีปรับสภาพแวดล้อม ศึกษาผลร่วมของการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลและการเพิ่ม CO_2 โดยวางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in Completely Randomized Design : CRD) รวมทั้งสิ้น 10 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ ใช้ความเข้มข้นของ น้ำตาล 5 ระดับ คือ 3, 4, 5, 6 และ 7 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของ CO_2 2 ระดับ คือ สภาพห้องเลี้ยงปกติ (control) และสภาพห้องเลี้ยงที่มี CO_2 3,000 สตล. โดยเตรียมอาหารใส่ขวดทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร ขวดละ 20 มิลลิลิตร โดยนำยอดจากสภาพปลอดเชื้อ มาตัดเลี้ยงยอดยาวประมาณ 2 เซนติเมตร เลี้ยงในอาหารสูตรดังกล่าว บันทึกข้อมูลทุกสัปดาห์

กรรมวิธีที่ 1 สภาพห้องปกติ และ น้ำตาล 3%
กรรมวิธีที่ 2 สภาพห้องปกติ และน้ำตาล 4%
กรรมวิธีที่ 3 สภาพห้องปกติ และ น้ำตาล 5%
กรรมวิธีที่ 4 สภาพห้องปกติ และ น้ำตาล 6%
กรรมวิธีที่ 5 สภาพห้องปกติ และน้ำตาล 7%
กรรมวิธีที่ 6 สภาพห้องเพิ่ม CO_2 3,000 สตล. และน้ำตาล 3%
กรรมวิธีที่ 7 สภาพห้องเพิ่ม CO_2 3,000 สตล. และ น้ำตาล 4%
กรรมวิธีที่ 8 สภาพห้องเพิ่ม CO_2 3,000 สตล. และน้ำตาล 5%
กรรมวิธีที่ 9 สภาพห้องเพิ่ม CO_2 3,000 สตล. และ น้ำตาล 6%
กรรมวิธีที่ 10 สภาพห้องเพิ่ม CO_2 3,000 สตล. และน้ำตาล 7%

บันทึกผล : จำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนราก ความยาวราก จำนวนใบ ระดับสีของใบ ขนาดโคนต้นเฉลี่ยที่เกิดต่อชิ้นส่วน

3.3 การเจริญเติบโตของต้นกล้า ที่ย้ายปลูกจากสภาพปลอดเชื้อ

ก. วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1) ต้นกล้าที่สมบูรณ์

2) ตะกร้าเพาะปลูก

3) ดินร่วน ทรายหยาบ แกลบดำ

4) ไม้บรรทัด สายวัด

5) เครื่องวัดพื้นที่ใบ

6) เครื่องวัดความชื้น

3.3.1 ผลของวัสดุปลูก และความชื้นในอากาศ มีต่อการรอดตายของต้นกล้า

ศึกษาตัวแปร 2 ปัจจัย คือ

1. วัสดุปลูก แบ่งเป็น 4 ชนิด คือ ดินร่วน ทรายหยาบ แกลบดำปนทราย และดินปนทราย
2. สภาพความชื้นแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ สภาพห้องปกติ (control) และห้องที่ควบคุมความชื้นที่ระดับความชื้นประมาณ 75%

เตรียมวัสดุดังกล่าวใส่ในตะกร้าและย้ายปลูกต้นกล้าจากสภาพปลอดเชื้อ โดยล้างวุ้นออกจากต้นกล้าให้หมดด้วยน้ำสะอาด แล้วจึงนำไปย้ายปลูกลงวัสดุปลูกดังกล่าว จากนั้นนำไปวางเลี้ยงภายในห้องที่ควบคุมความชื้นของโรงเรือนพลาสติกสภาพปิดและห้องปกติ control รดน้ำสม่ำเสมอเช่นเดียวกันทั้งสองห้อง ทำการทดลองในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2544 วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorials in Completely Randomized Design : CRD) รวมทั้งสิ้น 8 กรรมวิธี จำนวนมี 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ต้น

กรรมวิธีที่ 1 สภาพห้อง control และดินร่วน

กรรมวิธีที่ 2 สภาพห้อง control และทรายหยาบ

กรรมวิธีที่ 3 สภาพห้อง control และแกลบดำปนทราย

กรรมวิธีที่ 4 สภาพห้อง control และดินปนทราย

กรรมวิธีที่ 5 สภาพห้องความชื้นที่ระดับความชื้น 75% และดินร่วน

กรรมวิธีที่ 6 สภาพห้องความชื้นที่ระดับความชื้น 75% และทรายหยาบ

กรรมวิธีที่ 7 สภาพห้องความชื้นที่ระดับความชื้น 75% และแกลบดำปนทราย

กรรมวิธีที่ 8 สภาพห้องความชื้นที่ระดับความชื้น 75% และดินปนทราย

บันทึกผล : เปอร์เซ็นต์การรอดตายของต้นกล้า

3.3.2 การเจริญเติบโตของต้นตะไคร้ต้นที่รอดตายจากการย้ายปลูก

ทำการทดลองสองชุด คือ ชุดแรกปลูกเลี้ยงนาน 7 เดือน ชุดที่สองปลูกเลี้ยงนาน 3 เดือน แต่ละชุดมีจำนวนซ้ำ 20 ต้น โดยนำต้นกล้าจากที่รอดตายจากการย้ายปลูกดังกล่าวนำมาย้ายลงถุงดำที่มีวัสดุปลูกผสมของ ดิน : แกลบดำ : ทราย เท่ากับ 2 : 2 : 1 โดยปริมาตร และเลี้ยงไว้ภายใต้แสงร่ำไรด้วยตาข่ายพรางแสงประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ บันทึกข้อมูลทุกเดือน

บันทึกผล : ความสูงของต้น จำนวนใบต่อต้น

ศึกษาพื้นที่ใบ โดยเปรียบเทียบระยะเวลาการเลี้ยงมี 2 ระดับคือเลี้ยงนาน 3 , 7 เดือน และตำแหน่งใบมี 2 ระดับคือ ใบที่ 4-5 , 9-10 แบบการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorials in Completely Randomized Design : CRD) รวมทั้งสิ้น 4 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 20 ซ้ำ โดยนำต้นกล้าที่เลี้ยงไว้ข้างต้นทำการวัดพื้นที่ใบดูการเจริญเติบโต

กรรมวิธีที่ 1 ต้นที่เลี้ยงนาน 3 เดือน และ ตำแหน่งใบที่ 4-5

กรรมวิธีที่ 2 ต้นที่เลี้ยงนาน 3 เดือน และ ตำแหน่งใบที่ 9-10

กรรมวิธีที่ 3 ต้นที่เลี้ยงนาน 7 เดือน และ ตำแหน่งใบที่ 4-5

กรรมวิธีที่ 4 ต้นที่เลี้ยงนาน 7 เดือน และ ตำแหน่งใบที่ 9-10

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ และภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาในการศึกษา เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2541 ถึง เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2544