บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการ

การศึกษาลักษณะของเอื้องมรกต ที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ แบ่งออกเป็น 4 การทดลอง คือ **การทดลองที่ 1 โครงสร้างของต้นเอื้องมรกต การทดลองที่ 2 การขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ การทดลองที่ 3 การเพาะเลี้ยงอับเรณู** และ **การทดลองที่ 4 ผลของอายุฝักต่อการงอกของเมล็ด**

อุปกรณ์และวิธีการทดลองมีดังต่อไปนี้

การทดลองที่ 1 โครงสร้างของต้นเอื้องมรกต

การศึกษาโครงสร้างของต้นเอื้องมรกตแบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อยคือการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นพืช และการศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยาของส่วนประกอบของต้นพืช ซึ่งแต่ละการทดลองมีอุปกรณ์และวิธีการดังต่อไปนี้

การทดลองที่ 1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นพืชทดลอง มีอุปกรณ์ และวิธีการดังต่อไปนี้

1.1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.1.1.1 พืชทดลอง ได้แก่ ต้นเอื้องมรกตจำนวน 5 ต้น ซึ่งคัดเลือกมาจากต้นพืชที่เก็บรวบรวม และปลูกเลี้ยงไว้ในแปลงรวบรวมพันธุ์ ต้นพืชดังกล่าวมีขนาดและระยะของการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน

1.1.1.2 อุปกรณ์ ได้แก่ มีดผ่าตัด ปากคีบ ไม้บรรทัด สมุด ปากกา ดินสอดำ และ กระดาษสำหรับวาดภาพ

1.1.2 วิธีการ

1.1.2.1 บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของส่วนประกอบของต้นพืชทดลอง ซึ่งได้แก่ หัว ใบ ช่อดอก ดอก และ ผล ในระยะที่ต้นและดอกเจริญเติบโตเต็มที่ โดยบันทึกลักษณะจากตัวอย่าง 5 ต้น พร้อมทั้งวาดภาพทางพฤกษศาสตร์ประกอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1.2.2 บันทึกจำนวนและขนาดของส่วนประกอบของต้นดังนี้

1.1.2.2.1 **หัว** จำนวนหัวต่อต้น เส้นผ่าศูนย์กลางหัว และ จำนวนปล้องต่อหัว

1.1.2.2.2 **ใบ** จำนวนใบต่อต้น และ ขนาดของใบในตำแหน่งใบที่ 2 จากโคนต้น

1.1.2.2.3 **ช่อดอก** ขนาดของช่อดอก และ จำนวนดอกต่อช่อ

1.1.2.2.4 **ดอก** ขนาดของดอก

1.1.2.2.5 **ผล** ขนาดของผล

การทดลองที่ 1.2 การศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยา

ศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยาของเนื้อเยื่อของ ยอด ใบ ดอก และ ก้านช่อดอก โดยศึกษาจากเนื้อเยื่อที่ตัดตามขวางและตามยาวของอวัยวะดังกล่าว ตามวิธีการศึกษาเนื้อเยื่อแบบ paraffin embedding ที่บรรยายไว้โดย Johansen (1940)

1.2.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1.2.1.1.1 เครื่องตัดชิ้นส่วนพืชแบบล้อหมุน

1.2.1.1.2 กล้องจุลทรรศน์แบบ dissecting microscope และ stereo microscope พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

1.2.1.1.3 ตู้อบที่ปรับอุณหภูมิเป็น 56 ˚ซ

1.2.1.1.4 แผ่นให้ความร้อน

1.2.1.1.5 เครื่องอุ่นสไลด์ที่ปรับอุณหภูมิเป็น 40 ˚ซ

1.2.1.1.6 แท่งไม้สี่เหลี่ยมขนาด 1.5×1.5×1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร

1.2.1.1.7 แผ่นกระจกสไลด์ (slide) และ แผ่นกระจกปิดสไลด์ (cover slip)

1.2.1.1.8 อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดใส่ชิ้นส่วนพืช บีกเกอร์ และ ขวดย้อมสี

1.2.1.1.9 อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ ตะเกียงแอลกอฮอล์ ป้ายติดกาว พู่กันขนอ่อน มีดผ่าตัด และปากคีบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.1.2 สารเคมี

1.2.1.2.1 น้ำยารักษาสภาพเซลล์ (fixtative) ได้แก่ FAA (formalin-acetic acid-alcohol) ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสม ดังนี้

95% ethyl alcohol	50	มล
glacial acetic acid	5	มล
formalin	10	มล
น้ำกลั่น	35	มล

1.2.1.2.2 น้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution) ประกอบด้วยส่วนผสมดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนผสมของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์

ขั้นตอน	ปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ (%)	95% ethyl alcohol (มล)	100% ethyl alcohol (มล)	tertiary butyl alcohol (TBA)(มล)	น้ำกลั่น (มล)
1	50	40	-	10	50
2	70	50	-	20	30
3	85	50	-	35	15
4	95	45	-	55	-
5	100	-	25	75	-

1.2.1.2.3 สารตัวกลางที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อ (embedding media) ได้แก่ Paraplast

1.2.1.2.4 น้ำยายึดเนื้อเยื่อพืชให้ติดแผ่นสไลด์ (adhesive) เตรียมน้ำยาเข้มข้นจากส่วนผสมของไข่ขาว 1 มล และน้ำกลั่น 49 มล เมื่อจะใช้จึงนำน้ำยาเข้มข้นดังกล่าวนั้นมาเจือจางโดยนำน้ำยาเข้มข้น 1 มล มาเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวมเป็น 50 มล

1.2.1.2.5 สีย้อมเนื้อเยื่อใช้สี Delafield's hematoxylin ซึ่งประกอบด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

aluminium sulfate [$Al_2(SO_4)_3.16H_2O$]	400	มล
hematoxylin ($C_{16}H_{14}O_6$)	4	กรัม
95% ethyl alcohol	25	มล
methyl alcohol	100	มล
glycerol	100	มล

1.2.1.2.6 น้ำยาทำให้เนื้อเยื่อสะอาด (clearing reagent) คือ xylene

1.2.1.2.7 สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นกระจกสไลด์ คือ Canada balsam

1.2.2 วิธีการ

การเตรียมสไลด์ถาวรของชิ้นส่วนพืชมีวิธีการเป็นขั้นตอนดังนี้

1.2.2.1 เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อของ ยอด ใบ ดอก และ ก้านช่อดอก มาแช่ใน FAA ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้ว แล้วนำขวดนั้นไปใส่ในเครื่องดูดอากาศเพื่อไล่ฟองอากาศออกจากเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนานอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปผ่านขั้นตอนต่อไป

1.2.2.2 นำเนื้อเยื่อมาผ่านขั้นตอนของการดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยให้ผ่านน้ำยาจากระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในน้ำยา 50% ไปจนถึงระดับ 100% TBA และน้ำยาที่เป็นส่วนผสมของ TBA และพาราฟินเหลวในอัตราส่วน 1:1 เมื่อถึงขั้นตอนนี้แล้วเนื้อเยื่อเหล่านั้นก็พร้อมที่จะรับการซึมแทรกพาราฟิน (infiltration)

1.2.2.3 ถ่ายเนื้อเยื่อลงไปในขวดแก้วที่บรรจุพาราฟินที่หลอมแล้ว นำขวดแก้วไปเก็บไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 56 ˚ซ นานประมาณ 1 สัปดาห์หรือมากกว่า เพื่อให้พาราฟินแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อได้เต็มที่

1.2.2.4 นำเนื้อเยื่อมาฝังในพาราฟิน แล้วจัดตำแหน่งของเนื้อเยื่อให้อยู่ในตำแหน่งและระนาบที่ต้องการ เก็บแท่งเนื้อเยื่อไว้ในที่เย็น หรือในตู้เย็น

1.2.2.5 เมื่อจะตัดเนื้อเยื่อจึงนำแท่งพาราฟินไปตัดแต่งให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า จัดให้มีชิ้นส่วนพืชอยู่ตรงกลาง นำมาติดกับแท่งไม้ จากนั้นนำแท่งไม้นั้นไปบรรจุในช่องของเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุน ตัดเนื้อเยื่อตามยาวหรือตามขวางตามความเหมาะสม ให้หนา 13-15 ไมครอน เนื้อเยื่อที่ผ่านการตัดจะอยู่ในลักษณะของแถบเนื้อเยื่อ (paraffin ribbon)

1.2.2.6 นำแถบเนื้อเยื่อติดลงบนแผ่นกระจกสไลด์ด้วยน้ำยายึดเนื้อเยื่อพืช วางแผ่นกระจกสไลด์บนเครื่องอุ่นสไลด์จนแถบเนื้อเยื่อแห้ง และติดแน่นกับแผ่นกระจกสไลด์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.2.7 นำแผ่นกระจกสไลด์ที่ละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อแล้วไปย้อมสี

1.2.2.8 ปิดแผ่นกระจกสไลด์ด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์โดยใช้ Canada balsam ยึด

1.2.2.9 เมื่อแผ่นกระจกสไลด์แห้งสนิทนำไปศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์และบันทึกภาพเนื้อเยื่อ

การทดลองที่ 2 การขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ

การทดลองนี้เป็นการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของส่วนประกอบของต้นเอื้องมรกตในอาหารสูตร Vacin and Went (1949) ดัดแปลง ซึ่งในที่นี้เรียกว่าอาหารสูตร VW โดยศึกษาถึงผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใส่ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อที่นำไปเลี้ยง

เนื้อเยื่อของพืชทดลองที่ใช้ในการทดลอง คือ เนื้อเยื่อของอวัยวะ 3 ส่วนของต้นพืช ได้แก่ เนื้อเยื่อปลายยอด เนื้อเยื่อของใบ และ เนื้อเยื่อของก้านช่อดอก สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในการทดลอง คือ ไซโตไคนิน 3 ชนิด ได้แก่ N^6-benzyladenine (BA), thidiazuron (TDZ) และ zeatin ส่วนออกซินที่ในการทดลองมีชนิดเดียว คือ napthalene acetic acid (NAA)

การทดลองขยายพันธุ์พืชทดลองในสภาพปลอดเชื้อนี้แบ่งการทดลองออกเป็นการทดลองย่อย อีก 3 การทดลอง คือ 1) ผลของไซโตไคนินต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนที่นำไปเพาะเลี้ยง 2) ผลของไซโตไคนินร่วมกับ NAA ต่อการเจริญเติบโตของต้นหรือโปรโตคอร์ม และ 3) ผลของสภาพอาหารต่อการเจริญเติบโตของต้นหรือโปรโตคอร์ม โดยที่การทดลองทั้ง 3 การทดลองนี้มีวิธีการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงพื้นฐาน และการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อการเพาะเลี้ยงเหมือนกัน แตกต่างกันตรงชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใส่ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงมาตรฐานตามระบุไว้ในกรรมวิธีต่าง ๆ จึงใช้อุปกรณ์ และวิธีการในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงพื้นฐาน และในการเตรียมเนื้อเยื่อพืชแบบเดียวกัน ดังนี้

2.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.1.1 ตู้กรองอากาศแบบ air flow cabinet

2.1.2 ชั้นสำหรับวางหลอดเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.1.3 เครื่องเขย่า

2.1.4 เครื่องชั่งละเอียด

2.1.5 กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ส่องกลับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.6 เครื่องวัดความเป็นกรด/ด่าง

2.1.7 หม้อนึ่งความดันไอ

2.1.8 เตาไฟฟ้า

2.1.9 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 50 มล

2.1.10 ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 และ 200 มล

2.1.11 หลอดทดลองขนาด 25 × 150 มม

2.1.12 ปิเปต หลอดหยด บีกเกอร์ และ กระบอกวัดปริมาตร

2.1.13 กรวยแก้ว จานเพาะเชื้อ ช้อนตักสาร ขวดใส่สารละลายเข้มข้น และกระดาษอะลูมิเนียมฟอยล์

2.1.14 อุปกรณ์ที่ใช้ในตู้กรองอากาศ คือ ด้ามมีดผ่าตัด เบอร์ 3 ใบมีดผ่าตัดเบอร์ 10 และ 11 ปากคีบ ตะเกียงแอลกอฮอล์ แผ่นพลาสติกขนาด 70 × 90 มม และ หลอดทดลอง

2.1.15 วัสดุอื่นๆ ได้แก่ ยางรัด และ แผ่นป้าย

2.2 สารเคมี วัสดุ และวิธีการ สำหรับเตรียมสารละลายต่าง ๆ เพื่อการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง สูตร VW

2.2.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง

2.2.1.1 สารละลายเข้มข้น

2.2.1.1.1 ธาตุอาหารหลัก ตามสูตร VW เตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น โดยมีความเข้มข้นมากกว่าสูตรมาตรฐาน 20 เท่า และเตรียมให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล โดยใช้ชนิดและปริมาณของสารดังแสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ชนิดและปริมาณของสารในสารละลายธาตุอาหารหลักสูตร VW

ชนิด	ปริมาณตามสูตรมาตรฐาน (มก/ล)	ปริมาณในสารละลายเข้มข้น 20 เท่า (ก/ล)
KNO_3	525	10.50
$(NH_4)_2SO_4$	500	10.00
KH_2PO_4	250	5.00
$MgSO_4.7H_2O$	250	5.00
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	151	3.02

2.2.1.1.2 ธาตุอาหารหลักตามสูตร MS เตรียมให้เป็นสารละลายเข้มข้นที่มีความเข้มข้นมากกว่าสูตรมาตรฐาน 20 เท่า และเตรียมให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล ชนิดและปริมาณของสารที่ใช้แสดงในตารางที่ 3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3 ชนิดและปริมาณของสารในสารละลายธาตุอาหารหลักสูตร MS

ชนิด	ปริมาณตามสูตรมาตรฐาน (มก/ล)	ปริมาณในสารละลายเข้มข้น 20 เท่า (ก/ล)
$CaCl_2.2H_2O$	44	8.8
KNO_3	370	38.0
KH_2PO_4	170	3.4
$MgSO_4.7H_2O$	1,900	7.4
NH_4NO_3	1,650	33.0

2.2.1.1.3 ธาตุอาหารรองตามสูตร MS (Murashige and Skoog ; 1962) โดยใช้ชนิด และปริมาณของสารดังแสดงใน ตารางที่ 4 การเตรียมสารละลายธาตุอาหารรองสูตรนี้เตรียมโดยให้เป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นของสารมากกว่าสูตรมาตรฐาน 100 เท่า และเตรียมให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล

ตารางที่ 4 ชนิดและปริมาณของสารในสารละลายธาตุอาหารรองสูตร MS

ชนิด	ปริมาณตามสูตรมาตรฐาน (มก/ล)	ปริมาณในสารละลายเข้มข้น 100 เท่า (มก/ล)
$MnSO_4.4H_2O$	22.33	2,230.0
$ZnSO_4.7H_2O$	8.60	860.0
H_3BO_3	6.20	620.0
KI	0.83	83.0
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	25.0
$CoCl_2.6H_2O$	0.25	2.5
$CuSO_4.5H_2O$	0.25	2.5

2.2.1.1.4 สารละลายเหล็กในรูป FeEDTA ในสูตร MS ประกอบด้วย $FeSO_4.7H_2O$ และ Na_2EDTA ทำให้เป็นสารละลายเข้มข้นรวมให้มีความเข้มข้นเป็น 100 เท่า และให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล โดยชั่งสารแต่ละชนิดมาละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายแต่ละส่วนเป็น 500 มล แล้วจึงนำมาผสมกันเก็บรักษาไว้ในขวดสีชา เพื่อป้องกันแสง ใช้สารเคมีตามปริมาณดังแสดงในตารางที่ 5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 5 ชนิดและปริมาณของสารเคมีในสารละลายเหล็กเข้มข้นสูตร MS

ชนิด	ปริมาณตามสูตรมาตรฐาน (มก/ล)	ปริมาณในสารละลายเข้มข้น 100 เท่า (มก/ล)
$FeSO_4.7H_2O$	27.8	2.78
Na_2EDTA	37.3	3.73

2.2.1.1.5 อินทรีย์สาร ซึ่งประกอบด้วย วิตามินชนิด glycine และ myo-inositol เตรียมเป็นสารละลายเข้มข้นที่มีความเข้มข้นของสารเป็น 100 เท่า และเตรียมให้มีปริมาตรสุดท้าย เป็น 1,000 มล โดยใช้ปริมาณของสารตามระบุไว้ในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ชนิดและปริมาณของสารในสารละลายเข้มข้นของอินทรีย์สารสูตร MS

ชนิด	ปริมาณตามสูตรมาตรฐาน (มก/ล)	ปริมาณในสารละลายเข้มข้น 100 เท่า (มก/ล)
Myo - inositol	100.00	10,000
Glycine	2.00	200
Thiamine.HCl	0.25	25
Pyridoxin.HCl	0.25	25
Nicotinic acid	0.25	25

2.2.1.1.6 วัสดุอื่น ๆ ได้แก่ ผงวุ้นตราเฮลิคอปเตอร์ น้ำมะพร้าว น้ำตาลซูโครส ยางรัด แผ่นป้าย และ วัสดุที่ใช้สำหรับทำความสะอาด และฆ่าเชื้อ ซึ่ง ได้แก่ น้ำยาล้างจาน เอทิลแอลกอฮอล์ เข้มข้น 70% คลอร็อกซ์ (active ingredient : NaOCl 5.25%) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และ สารลดแรงตึงผิว (Tween 20)

2.3 วิธีการเตรียมอาหารสูตร VW

เตรียมอาหารเหลวปริมาตร 1,000 มล ดังขั้นตอนต่อไปนี้

2.3.1 เติมน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มล ประมาณ 200 มล

2.3.2 เติมสารละลายของธาตุอาหารหลักในสูตร VW ที่มีความเข้มข้น 20 เท่า (เตรียมตามตาราง 2) ลงไป 50 มล เขย่าให้เข้ากัน

2.3.3 เติมสารละลายของธาตุอาหารรองสูตร MS ที่มีความเข้มข้น 100 เท่า (เตรียมตามตาราง 4) ลงไป 10 มล เขย่าให้เข้ากัน

2.3.4 เติมสารละลาย FeEDTA ที่มีความเข้มข้น 100 เท่า (เตรียมตามตาราง 5) ลงไป 10 มล เขย่าให้เข้ากัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.5 เติมสารละลายอินทรีย์สารที่มีความเข้มข้น 100 เท่า (เตรียมตามตาราง 6) ลงไป 10 มล เขย่าให้เข้ากัน

2.3.6 เติมน้ำมะพร้าวลงไป 150 มล (15%)

2.3.7 น้ำตาลซูโครส 20 ก เขย่าให้น้ำตาลละลาย (2%)

2.3.8 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล

2.3.9 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้เป็น 5.7

2.3.10 บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 50 มล ขวดละ 10 มล ปิดด้วยแผ่นพลาสติกทนร้อน ใช้ยางรัด นำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอที่ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้จนเย็นก่อนนำไปใช้

2.4 วิธีการเตรียมอาหารสูตร MS เตรียมเหมือนการเตรียมอาหารสูตร VW ในข้อ 2.3 แต่เปลี่ยนเป็นสารละลายของธาตุอาหารหลักในสูตร Murashige and Skoog (1962) 20 เท่า (เตรียมตามตาราง 3)

2.5 วิธีการเตรียมอาหารสูตร VW โดยใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต

2.5.1 วิธีการเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต มีดังนี้

2.5.1.1 ไซโตไคนิน 3 ชนิดที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ BA, TDZ และ zeatin

2.5.1.1.1 การเตรียม BA โดยชั่ง BA 1 มก ละลายด้วย 1N KOH เล็กน้อยแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มล

2.5.1.1.2 การเตรียม TDZ โดยชั่ง TDZ 0.5 มก ละลายด้วย 1N KOH เล็กน้อยแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มล

2.5.1.1.3 การเตรียม zeatin โดยชั่ง zeatin 2 มก ละลายด้วย 1N KOH เล็กน้อยแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มล นำสารละลาย zeatin มากรองภายในตู้ปลอดเชื้อ โดยใช้กระบอกฉีดยาดูดสารละลายแล้วฉีดผ่านเยื่อกรอง โดยมีขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มล มารองรับสารละลายที่ปลอดเชื้อที่ผ่านออกมา อุปกรณ์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องต้องผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

2.5.1.2 ออกซิน 2 ชนิด ได้แก่ NAA และ 2,4-D

2.5.1.2.1 เตรียม NAA โดยชั่ง NAA 1 มก ละลายด้วย absolute ethanol เล็กน้อยแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มล

2.5.1.2.2 เตรียม 2,4-Dโดยชั่ง 2,4-D 8 มก ละลายด้วย absolute ethanol เล็กน้อยแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5.2 วิธีการเตรียมอาหารสูตร VW ที่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโตตามกรรมวิธีต่าง ๆ นั้นขั้นตอนการเตรียมอาหารพื้นฐานเตรียมตามขั้นตอนข้อ 2.3 (2.3.1-2.3.10) จากการที่อาหารพื้นฐานที่จะต้องใช้ในการทดลองนั้นใช้ในปริมาณมาก คือ รวมเป็น 400 มล จึงมีขั้นตอนของการเตรียมอาหารพื้นฐานเข้มข้นตามขั้นตอนดังนี้

2.5.2.1 ปรับปริมาตรอาหารพื้นฐานด้วยน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 มล

2.5.2.2 แบ่งอาหารพื้นฐานอย่างละ 50 มล 4 กรรมวิธี ลงในบีกเกอร์

2.5.2.3 ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เตรียมไว้ในแต่ละการทดลอง โดยปรับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต ตามกรรมวิธีในแต่ละการทดลองโดยใช้ปริมาตรของส่วนผสมตามตารางที่ 7-9 และปรับปริมาตรสุดท้ายในแต่ละกรรมวิธีด้วยน้ำกลั่นอย่างละ 50 มล ใส่ลงในอาหารพื้นฐานที่แบ่งไว้ในแต่ละกรรมวิธี

2.5.2.4 นำแต่ละกรรมวิธี มาปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 5.7

2.5.2.5 ใส่วุ้นกรรมวิธีละ 0.8 ก

2.5.2.6 นำไปต้มในไมโครเวฟให้เดือดแล้วเทลงในหลอดทดลองหลอดละ 10 มล ในแต่ละกรรมวิธี

2.5.2.7 หุ้มด้วยพลาสติก และกระดาษ รัดยาง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำมาตั้งทิ้งไว้จนอาหารวุ้นเย็นและแข็ง จึงนำไปทดลอง

ตารางที่ 7 การเตรียมอาหารที่มีความเข้มข้นของ BA ต่างกัน

สารละลาย (มล)	ความเข้มข้นของ BA (มก/ล)			
	0	0.1	1.0	2.0
อาหารพื้นฐาน + สารประกอบอินทรีย์	50	50	50	50
ปริมาตรสารละลาย BA	0	2	20	40

ตารางที่ 8 การเตรียมอาหารที่มีความเข้มข้นของ TDZ ต่างกัน

สารละลาย (มล)	ความเข้มข้นของ TDZ (มก/ล)			
	0	0.01	0.1	1.0
อาหารพื้นฐาน + สารประกอบอินทรีย์	50	50	50	50
ปริมาตรสารละลาย TDZ	0	5	25	50

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 9 การเตรียมอาหารที่มีความเข้มข้นของ zeatin ต่างกัน

สารละลาย (มล)	ความเข้มข้นของ zeatin (มก/ล)			
	0	0.1	5.0	10.0
อาหารพื้นฐาน + สารประกอบอินทรีย์	50	50	50	50
ปริมาตรสารละลาย zeatin	0	0.2	2.0	20

2.5.3 วิธีการเตรียมอาหารสูตร VW ที่ใส่ไซโตไคนิน ร่วมกับ NAA

ใช้อาหารวุ้นสูตร VW ซึ่งให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล และเตรียมตามขั้นตอนข้อ 2.5.2 แต่ปรับความเข้มข้นของไซโตไคนิน (BA, TDZ หรือ zeatin) ร่วมกับ NAA 5 ระดับคือ 0, 0.05, 0.5, 1.0 และ 2.0 มก/ล ตามกรรมวิธีดังกล่าว แล้วใช้ปริมาตรของส่วนผสมตามตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ปริมาตรของอาหารความเข้มข้นของไซโตไคนิน (BA, TDZ หรือ zeatin) และ NAA ในกรรมวิธีต่างกัน

NAA	ไซโตไคนิน (มก/ล)			
มก/ล	0	0.1	1.0	2.0
0	อาหารพื้นฐาน 25 มล ไซโตไคนิน 0 มล NAA 0 มล	อาหารพื้นฐาน 25 มล ไซโตไคนิน 0.5 มล NAA 0 มล	อาหารพื้นฐาน 25 มล ไซโตไคนิน 5 มล NAA 0 มล	อาหารพื้นฐาน 25 มล ไซโตไคนิน 10 มล NAA 0 มล
0.05	อาหารพื้นฐาน 25 มล ไซโตไคนิน 0 มล NAA 0.25 มล	อาหารพื้นฐาน 25 มล ไซโตไคนิน 0.5 มล NAA 0.25 มล	อาหารพื้นฐาน 25 มล ไซโตไคนิน 5 มล NAA 0.25 มล	อาหารพื้นฐาน 25 มล ไซโตไคนิน 10 มล NAA 0.25 มล
0.5	อาหารพื้นฐาน 25 มล ไซโตไคนิน 0 มล NAA 2.5 มล	อาหารพื้นฐาน 25 มล ไซโตไคนิน 0.5 มล NAA 2.5 มล	อาหารพื้นฐาน 25 มล ไซโตไคนิน 5 มล NAA 2.5 มล	อาหารพื้นฐาน 25 มล ไซโตไคนิน 10 มล NAA 2.5 มล
1.0	อาหารพื้นฐาน 25 มล ไซโตไคนิน 0 มล NAA 5 มล	อาหารพื้นฐาน 25 มล ไซโตไคนิน 0.5 มล NAA 5 มล	อาหารพื้นฐาน 25 มล ไซโตไคนิน 5 มล NAA 5 มล	อาหารพื้นฐาน 25 มล ไซโตไคนิน 10 มล NAA 5 มล
2.0	อาหารพื้นฐาน 25 มล ไซโตไคนิน 0 มล NAA 10 มล	อาหารพื้นฐาน 25 มล ไซโตไคนิน 0.5 มล NAA 10 มล	อาหารพื้นฐาน 25 มล ไซโตไคนิน 5 มล NAA 10 มล	อาหารพื้นฐาน 25 มล ไซโตไคนิน 10 มล NAA 10 มล

เตรียมอาหารปริมาตรสุดท้ายกรรมวิธีละ 50 มล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5.4 วิธีการเตรียมอาหารสูตร VW ที่ใส่ไซโตไคนิน (BA) และ 2,4-D

ใช้อาหารวุ้นสูตร VW ซึ่งให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,200 มล และเตรียมตามขั้นตอนแต่ปรับความเข้มข้นของ BA และ 2,4-D ตามกรรมวิธี แล้วใช้ปริมาตรของส่วนผสมตามตาราง 11 และใช้วุ้น 0.4 %

ตารางที่ 11 ระดับของอุณหภูมิ ปริมาตรของอาหาร ความเข้มข้นของ BA และ 2,4-Dในกรรมวิธีต่างกัน ใช้อาหารวุ้นสูตร VW

อุณหภูมิ (˚ซ)	VW		
	2,4-D (มก/ล)		
	0	2	4
7	0 มล	30 มล	60 มล
25	0 มล	30 มล	60 มล
35	0 มล	30 มล	60 มล

2.6 การเตรียมเนื้อเยื่อที่ใช้เป็นวัสดุทดลอง

เนื้อเยื่อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเตรียมดังนี้

2.6.1 เนื้อเยื่อปลายยอด

การได้มาของเนื้อเยื่อปลายยอดของพืชทดลอง คือ การนำฝักอ่อนที่มีอายุ 8 สัปดาห์ ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW เมื่อได้ต้นอ่อนจากเมล็ดแล้วจึงนำต้นอ่อนเหล่านั้นมาตัดเอาปลายยอดโดยตัดมาเฉพาะส่วนปลายให้มีความยาวจากปลายเป็น 2-3 มม

2.6.2 เนื้อเยื่อใบ

เนื้อเยื่อใบที่ใช้ทดลองเป็นเนื้อเยื่อของใบคู่แรกของต้นอ่อน โดยที่การได้มาของต้นอ่อนนี้ได้มาจากวิธีการเดียวกับที่ระบุไว้ในข้อ 2.6.1 การเตรียมเนื้อเยื่อของใบ เพื่อการทดลองทำโดยการตัดเนื้อเยื่อของใบคู่แรกของต้นอ่อนนั้นให้มีขนาด 0.5 × 0.5 มม โดยเลือกใบที่สมบูรณ์ และมีสีเขียว

2.6.3 เนื้อเยื่อก้านช่อดอก

ก้านช่อดอกที่นำมาเป็นวัสดุทดลองนี้ เป็นก้านช่อดอกของต้นพืชทดลองที่เจริญเติบโต และออกดอกในแปลงทดลอง ช่อดอกที่นำมาตัดเอาเนื้อเยื่อของก้านช่อดอกนี้เป็นช่อดอกอ่อนที่ดอกทุกดอกยังอยู่ในระยะดอกตูม วิธีการเตรียมก้านช่อดอกเพื่อการนี้ คือ การตัดช่อดอกทั้งช่อมาแล้วตัดดอกอ่อนออกให้หมด นำก้านช่อมาทำความสะอาดเบื้องต้น โดยล้างให้สะอาด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70% นำไปเขย่าในสารละลายคลอร็อกซ์ 10% นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 โดยให้น้ำกลั่นไหลผ่านเป็นเวลา 15 นาที นำมาล้างด้วยน้ำยาล้างจานเจือจางแล้วล้างอีกครั้งด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด นำไปเขย่าในสารละลายแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 5 นาที แล้วฟอกด้วยคลอร็อกซ์ 20 % นาน 15 นาที ตามด้วยการนำไปเขย่าในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 5% เป็นเวลา 1 นาที ต่อมาล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 3 ครั้ง ก้านช่อดอกที่ผ่านการทำความสะอาดแล้วนี้จะต้องมีการลอกเอากาบใบย่อยซึ่งหุ้มตาซึ่งปรากฏอยู่ที่ซอกของก้านช่อดอกย่อยออกเสียก่อน จากนั้นจึงนำก้านช่อดอกย้ายไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย Strepto เข้มข้น 1 กรัม/100 มล เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 3 ครั้ง ตัดเอาบริเวณข้อของก้านช่อดอกโดยให้ปลายทั้ง 2 ข้างห่างจากข้อประมาณ 0.5 ซม ซึ่งชิ้นส่วนของก้านช่อที่ตัดไปเพาะเลี้ยงนี้ใช้เฉพาะเนื้อเยื่อเพียง 2 ใน 3 ของก้านช่อดอกจากโคนช่อขึ้นมาเท่านั้น ส่วนปลายของก้านช่อดอกเป็นส่วนที่ไม่เหมาะสม เนื่องจากในส่วนนี้จะมีการเรียงของข้อถี่เกินไป เมื่อตัดชิ้นส่วนได้แล้วนำชิ้นส่วนเหล่านั้นไปเพาะลงในหลอดบรรจุอาหารแข็งสูตร VW ภายในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 27±1 ˚ซ ได้รับแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสงประมาณ 30 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที ตลอด 24 ชั่วโมง

2.7 การกำหนดกรรมวิธีการทดลอง

การกำหนดกรรมวิธีการทดลองในแต่ละการทดลองย่อย 3 การทดลองดังกล่าวไว้ข้างต้น มีดังนี้

2.7.1 ผลของไซโตไคนินต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนที่นำไปเพาะเลี้ยง

ในการทดลองย่อยนี้ศึกษาผลของไซโตไคนิน 3 ชนิด คือ BA, TDZ และ zeatin ในความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีต่อเนื้อเยื่อ 3 รูปแบบ โดยวางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) ในแต่ละชนิดของไซโตไคนิน โดยมีกรรมวิธีการทดลองในแต่ละส่วน ดังนี้

2.7.1.1 ผลของ BA ต่อเนื้อเยื่อปลายยอด ใบ และก้านช่อดอก

ในการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นของ BA 4 ระดับ คือ 0, 0.1, 1.0 และ 2.0 มก/ล กรรมวิธีการทดลองมี 12 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 8 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เนื้อเยื่อปลายยอด + BA 0 มก/ล
กรรมวิธีที่ 2 เนื้อเยื่อปลายยอด + BA 0.1 มก/ล
กรรมวิธีที่ 3 เนื้อเยื่อปลายยอด + BA 1.0 มก/ล
กรรมวิธีที่ 4 เนื้อเยื่อปลายยอด + BA 2.0 มก/ล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 5 เนื้อเยื่อใบ + BA 0 มก/ล
กรรมวิธีที่ 6 เนื้อเยื่อใบ + BA 0.1 มก/ล
กรรมวิธีที่ 7 เนื้อเยื่อใบ + BA 1.0 มก/ล
กรรมวิธีที่ 8 เนื้อเยื่อใบ + BA 2.0 มก/ล
กรรมวิธีที่ 9 เนื้อเยื่อก้านช่อดอก + BA 0 มก/ล
กรรมวิธีที่ 10 เนื้อเยื่อก้านช่อดอก + BA 0.1 มก/ล
กรรมวิธีที่ 11 เนื้อเยื่อก้านช่อดอก + BA 1.0 มก/ล
กรรมวิธีที่ 12 เนื้อเยื่อก้านช่อดอก + BA 2.0 มก/ล

หลังจากการเพาะเลี้ยงตามกรรมวิธีดังระบุแล้วนั้น นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงที่มีสภาพของห้องเพาะเลี้ยงดังกล่าวแล้วข้างต้น บันทึกการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อทุกสัปดาห์ และถ้าหากการเพาะเลี้ยงกรรมวิธีใดได้ผลก็บันทึก ระยะเวลาในการเกิดยอด ใบ และราก รวมทั้งความยาวของยอด ใบ และรากด้วย

2.7.1.2 ผลของ TDZ ต่อเนื้อเยื่อปลายยอด ใบ และ ก้านช่อดอก

การทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นของ TDZ 4 ระดับ คือ 0, 0.01, 0.1 และ 1.0 มก/ล กรรมวิธีการทดลองมี 12 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 8 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เนื้อเยื่อปลายยอด + TDZ 0 มก/ล
กรรมวิธีที่ 2 เนื้อเยื่อปลายยอด + TDZ 0.01 มก/ล
กรรมวิธีที่ 3 เนื้อเยื่อปลายยอด + TDZ 0.1 มก/ล
กรรมวิธีที่ 4 เนื้อเยื่อปลายยอด + TDZ 1.0 มก/ล
กรรมวิธีที่ 5 เนื้อเยื่อใบ + TDZ 0 มก/ล
กรรมวิธีที่ 6 เนื้อเยื่อใบ + TDZ 0.01 มก/ล
กรรมวิธีที่ 7 เนื้อเยื่อใบ + TDZ 0.1 มก/ล
กรรมวิธีที่ 8 เนื้อเยื่อใบ + TDZ 1.0 มก/ล
กรรมวิธีที่ 9 เนื้อเยื่อก้านช่อดอก + TDZ 0 มก/ล
กรรมวิธีที่ 10 เนื้อเยื่อก้านช่อดอก + TDZ 0.01 มก/ล
กรรมวิธีที่ 11 เนื้อเยื่อก้านช่อดอก + TDZ 0.1 มก/ล
กรรมวิธีที่ 12 เนื้อเยื่อก้านช่อดอก + TDZ 1.0 มก/ล

เมื่อเพาะเสร็จแล้วนำไปเลี้ยงในสภาพเดียวกับการทดลองในข้อ 2.7.1.1 และบันทึกผลเช่นเดียวกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.7.1.3 ผลของ zeatin ต่อเนื้อเยื่อปลายยอด ใบ และก้านช่อดอก

การทดลองนี้ใช้ zeatin 4 ระดับความเข้มข้น คือ 0, 1.0, 5.0 และ 10.0 มก/ล กรรมวิธีการทดลองมี 12 กรรมวิธี ใช้กรรมวิธีละ 8 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เนื้อเยื่อปลายยอด + zeatin 0 มก/ล
กรรมวิธีที่ 2 เนื้อเยื่อปลายยอด + zeatin 1.0 มก/ล
กรรมวิธีที่ 3 เนื้อเยื่อปลายยอด + zeatin 5.0 มก/ล
กรรมวิธีที่ 4 เนื้อเยื่อปลายยอด + zeatin 10.0 มก/ล
กรรมวิธีที่ 5 เนื้อเยื่อใบ + zeatin 0 มก/ล
กรรมวิธีที่ 6 เนื้อเยื่อใบ + zeatin 1.0 มก/ล
กรรมวิธีที่ 7 เนื้อเยื่อใบ + zeatin 5.0 มก/ล
กรรมวิธีที่ 8 เนื้อเยื่อใบ + zeatin 10.0 มก/ล
กรรมวิธีที่ 9 เนื้อเยื่อก้านช่อดอก + zeatin 0 มก/ล
กรรมวิธีที่ 10 เนื้อเยื่อก้านช่อดอก + zeatin 1.0 มก/ล
กรรมวิธีที่ 11 เนื้อเยื่อก้านช่อดอก + zeatin 5.0 มก/ล
กรรมวิธีที่ 12 เนื้อเยื่อก้านช่อดอก + zeatin 10.0 มก/ล

สภาพของการเพาะเลี้ยงตลอดจนวิธีการบันทึกเหมือนกับข้อ 2.7.1.1

2.7.2 ผลของไซโตไคนิน ร่วมกับ NAA ต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อน

การทดลองย่อยนี้เป็นการทดลองซึ่งสืบเนื่องมาจากผลการทดลองย่อยที่ได้ทดสอบผลของไซโตไคนิน 3 ชนิดดังระบุใน 2.7.1 โดยที่ เมื่อทดสอบได้ชนิดของไซโตไคนินที่ให้ผลดีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วจึงเลือกชนิดที่ให้ผลดีที่สุดมาทดสอบร่วมกับ NAA เพื่อศึกษาถึงผลที่มีต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนที่ไม่ตัดเอาส่วนปลายยอดออกและต้นอ่อนเหล่านั้นมีขนาด 2-3 × 0.5-0.7 มม ไซโตไคนินที่เลือกมานั้นใช้ความเข้มข้น 4 ระดับคือ 0, 0.1, 1.0 และ 2.0 มก/ล ส่วน NAA ใช้ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0, 0.05, 0.5 และ 10.0 มก/ล โดยมีกรรมวิธีรวม 20 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไซโตไคนิน 0 มก/ล + NAA 0 มก/ล
กรรมวิธีที่ 2 ไซโตไคนิน 0 มก/ล + NAA 0.05 มก/ล
กรรมวิธีที่ 3 ไซโตไคนิน 0 มก/ล + NAA 0.5 มก/ล
กรรมวิธีที่ 4 ไซโตไคนิน 0 มก/ล + NAA 1.0 มก/ล/
กรรมวิธีที่ 5 ไซโตไคนิน 0 มก/ล + NAA 2.0 มก/ล
กรรมวิธีที่ 6 ไซโตไคนิน 0.1 มก/ล + NAA 0 มก/ล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 7	ไซโตไคนิน	0.1	มก/ล	+ NAA	0.05	มก/ล
กรรมวิธีที่ 8	ไซโตไคนิน	0.1	มก/ล	+ NAA	0.5	มก/ล
กรรมวิธีที่ 9	ไซโตไคนิน	0.1	มก/ล	+ NAA	1.0	มก/ล/
กรรมวิธีที่ 10	ไซโตไคนิน	0.1	มก/ล	+ NAA	2.0	มก/ล
กรรมวิธีที่ 11	ไซโตไคนิน	1.0	มก/ล	+ NAA	0	มก/ล
กรรมวิธีที่ 12	ไซโตไคนิน	1.0	มก/ล	+ NAA	0.05	มก/ล
กรรมวิธีที่ 13	ไซโตไคนิน	1.0	มก/ล	+ NAA	0.5	มก/ล
กรรมวิธีที่ 14	ไซโตไคนิน	1.0	มก/ล	+ NAA	1.0	มก/ล/
กรรมวิธีที่ 15	ไซโตไคนิน	1.0	มก/ล	+ NAA	2.0	มก/ล
กรรมวิธีที่ 16	ไซโตไคนิน	2.0	มก/ล	+ NAA	0	มก/ล
กรรมวิธีที่ 17	ไซโตไคนิน	2.0	มก/ล	+ NAA	0.05	มก/ล
กรรมวิธีที่ 18	ไซโตไคนิน	2.0	มก/ล	+ NAA	0.5	มก/ล
กรรมวิธีที่ 19	ไซโตไคนิน	2.0	มก/ล	+ NAA	1.0	มก/ล
กรรมวิธีที่ 20	ไซโตไคนิน	2.0	มก/ล	+ NAA	2.0	มก/ล

เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงตามกรรมวิธีที่ระบุไว้ข้างต้นแล้ว นำไปเลี้ยงไว้ในสภาพเดียวกันกับการทดลองที่ระบุไว้ในข้อ 2.7.1.1 วิธีการบันทึกผลใช้วิธีเดียวกัน

2.7.3 ผลของสภาพอาหารต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อน

การทดลองย่อยนี้เป็นการศึกษาสภาพทางกายภาพของอาหารเพาะเลี้ยง VW ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนของพืชทดลอง กรรมวิธีการทดลอง คือ การเพาะเลี้ยงต้นอ่อนในอาหารเลี้ยง VW 2 สภาพคืออาหารแข็งซึ่งมีวุ้นเป็นส่วนประกอบและอาหารเหลวซึ่งไม่มีวุ้นเป็นส่วนประกอบ รวมเป็น 2 กรรมวิธี โดยมีกรรมวิธีละ 8 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ T-Test บันทึกผลการทดลองเช่นเดียวกับที่ระบุไว้ในข้อ 2.7.1.1

การทดลองที่ 3 การเพาะเลี้ยงอับเรณู

การเพาะเลี้ยงอับเรณูของพืชทดลองเป็นการนำเอาอับเรณูของดอกตูม 3 ขนาด มาเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร VW และ MS หลังจากนั้นศึกษาผลของการบ่มหลอดอาหารที่บรรจุอับเรณูจากดอกตูม 3 ขนาดนั้นในตู้ที่ควบคุมอุณหภูมิ 2 ระดับ ตามด้วยการศึกษาผลของการย้ายเนื้อเยื่ออับเรณูไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ ไซโตไคนิน 1 ชนิด ได้แก่ BA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ร่วมกับออกซิน 1 ชนิด ได้แก่ 2,4-D อุปกรณ์ วิธีการ กรรมวิธี และวิธีการบันทึกผลการทดลองที่ 3 นี้ มีได้ดังนี้

การทดลองที่ 3.1 ผลของขนาดของอับเรณูที่มีต่อการเพาะเลี้ยง

ในการศึกษาผลของขนาดของอับเรณูที่มีต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงนี้ มีขั้นตอนของการศึกษาเป็น 3 ขั้น คือ การบันทึกระยะของการเจริญของเรณูซึ่งอยู่ภายในอับเรณูที่มีอายุ 3 ระดับ คือ อับเรณูที่นำมาจากดอกตูมขนาดเล็ก ขนาดกลาง และ ขนาดใหญ่ โดยที่ดอกที่มีอายุ 3 ขนาดนั้น มีความยาวของดอกเป็น 0.15×0.3, 0.2×0.5 และ 0.3×0.8 มม ตามลำดับ ต่อจากนั้นจึงนำอับเรณูที่มีขนาดตามกรรมวิธีไปศึกษาเนื้อเยื่อตามวิธีการที่ระบุไว้ในการทดลองที่ 1.2 ส่วนการศึกษาการเพาะเลี้ยงอับเรณูนั้นเป็นการนำอับเรณู 3 ขนาด ดังระบุข้างต้นไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงสูตร VW โดยมีวัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลองดังต่อไปนี้

3.1.1 การศึกษาระยะของการเจริญของเรณูจากอับเรณู 3 ขนาด

3.1.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ ที่ใช้ในการศึกษา คือ ปากคีบ แผ่นกระจกสไลด์ แผ่นกระจกปิดสไลด์ และ กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope

3.1.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการย้อมเรณู คือ สี orcein

3.1.1.3 การเตรียมอับเรณูเพื่อนำเรณูมาย้อมสีนั้นทำโดยนำดอกตูม 3 ขนาด ที่ระบุไว้ในข้อ 3.1.1 มาวัดขนาดแล้วใช้ปากคีบนำอับเรณูมาวางบนแผ่นกระจกสไลด์ หยดสี orcein ลงไป 1-2 หยด หลังจากนั้นขยี้อับเรณูให้ละเอียดแล้วแช่ทิ้งไว้ 2-5 นาที ปิดด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์ ตรวจ และบันทึกระยะการเจริญของเรณูใต้กล้องจุลทรรรศน์ ส่วนหนึ่งของอับเรณูจากดอกตูมแต่ละขนาดนำไปศึกษาเนื้อเยื่อเหมือนกับที่ระบุไว้ในการทดลองที่ 1.2

3.1.1.4 สารเคมีสำหรับทำความสะอาด และฆ่าเชื้อ เหมือนกับที่ระบุไว้ใน ข้อ 2.2

3.1.2 การศึกษาเนื้อเยื่อของอับเรณู

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการศึกษาเนื้อเยื่อของอับเรณู 3 ขนาดนั้นใช้วิธีการเตรียมสไลด์ถาวรดังเสนอไว้ในการทดลอง 1.2

3.1.3 การเพาะเลี้ยงอับเรณู

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่ออับเรณู 3 กรรมวิธีมีดังนี้

3.1.3.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทดลองเหมือนกับที่ระบุไว้ในข้อ 2.1.1.6

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.3.2 สารเคมี และวิธีการเตรียมอาหารสูตร VW เหมือนกับที่ระบุไว้ในข้อ2.1 ถึง 2.3

3.1.3.3 วิธีการเตรียมเนื้อเยื่อที่ใช้เป็นวัสดุทดลอง คือ การเตรียมดอกตูม 3 กรรมวิธี แล้วนำไปฟอกฆ่าเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ โดยการฟอกดอกด้วยคลอร็อกซ์ 15% นาน 15 นาที แล้วนำไปเขย่าในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 2% เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง นำดอกมาวางบนจานเพาะเชื้อที่มีแผ่นพลาสติกที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ววางอยู่ ใช้มีดและปากคีบดึงเอากลีบดอกออกให้เหลือแต่เส้าเกสร แล้วใช้ปลายมีดแตะเอาเฉพาะอับเรณูมาวางบนอาหาร เลี้ยงอับเรณูทั้ง 3 กรรมวิธีในที่มืด วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์โดยมีกรรมวิธีการทดลอง 3 กรรมวิธี ตามขนาดของดอกตูม ในแต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีอับเรณู 2 อับ บันทึกการเปลี่ยนแปลงของอับเรณู ในช่วง 12 สัปดาห์หลังจากเพาะเลี้ยง โดยการสังเกต และติดตามการเกิดแคลลัส หรือการเกิดต้น

การทดลองที่ 3.2 ผลของอุณหภูมิ ไซโตไคนิน และ 2,4-D ต่อการเจริญเติบโตของอับเรณูในอาหารสูตร VW

การทดลองนี้เป็นการทดลองโดยมีขั้นตอนของการดำเนินการเป็น 3 ขั้นตอนดังกล่าวไว้แล้วข้างต้น โดยเริ่มจากขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงอับเรณูในอาหารเลี้ยงสูตร VW ตามวิธีการที่ระบุไว้ในข้อ 3.1 โดยใช้อับเรณูขนาดที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลอง 3.1 โดยที่ในขั้นตอนที่หนึ่งนี้เพาะเลี้ยงอับเรณูไว้เป็นเวลา 1 สัปดาห์ โดยเพาะอับเรณูจำนวน 1 อับในหลอดทดลองแต่ละหลอด ทำทั้งหมด 90 หลอด จากนั้นเป็นขั้นตอนที่ 2 ซึ่งเป็นขั้นตอนของการนำหลอดเพาะเลี้ยงทั้งหมดไปบ่มในตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิ 3 ระดับ คือ 25 ˚ซ 35 ˚ซ และ 7 ˚ซ กรรมวิธีละ 30 หลอดทดลอง จากนั้นเป็นขั้นตอนที่ 3 คือ ย้ายอับเรณูในแต่ละกรรมวิธีจากขั้นตอนที่ 2 ย้ายลงในอาหารวุ้นสูตร VW ที่เติม BA เข้มข้น 1 มก/ล และ 2,4-D เข้มข้น 0, 2 และ 4 มก/ล เป็นส่วนประกอบ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยมีกรรมวิธีการทดลองในขั้นตอนที่ 3 เป็น 3 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 BA 1 มก/ล + 2,4-D 0 มก/ล
กรรมวิธีที่ 2 BA 1 มก/ล + 2,4-D 2 มก/ล
กรรมวิธีที่ 3 BA 1 มก/ล + 2,4-D 4 มก/ล

บันทึกผลการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 3.3 ผลของอุณหภูมิ ไซโตไคนิน และ 2,4-D ต่อการเจริญเติบโตของอับเรณู ในอาหารสูตร MS

ในการทดลองนี้วัสดุ อุปกรณ์ ขั้นตอนของวิธีการดำเนินงาน และ การบันทึกผลการทดลองเหมือนกับที่บรรยายไว้ในการทดลองที่ 3.2 เพียงแต่สูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงนั้นเป็นสูตร MS แทนที่จะเป็นสูตร VW

การทดลองที่ 4 ผลของอายุฝักต่อการงอกของเมล็ด

การทดลองนี้เป็นการศึกษาถึงผลของอายุของฝักที่มีต่อการงอกของเมล็ด โดยการนำเมล็ดซึ่งมีระยะการเจริญเติบโตที่ต่างกันเนื่องจากเป็นเมล็ดที่อยู่ภายในฝักที่มีอายุแตกต่างกัน คือ อายุ 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 สัปดาห์มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร VW การทดลองนี้มีวัสดุและอุปกรณ์ซึ่งใช้ในการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับที่ระบุไว้ในข้อ 2.1 , 2.2 และ 3.1

สำหรับวิธีการทดลองนั้น ในขั้นตอนแรกเป็นการเตรียมฝักที่จะนำมาเพาะเลี้ยง โดยการผสมเกสรต้นเอื้องมรกตในตอนเช้า ซึ่งผสมเกสรด้วยมือ และเป็นการผสมแบบผสมตัวเองภายในดอกเดียวกัน หรือผสมข้ามดอกในช่อดอกเดียวกัน การผสมเกสรนั้นต้องเลือกดอกที่พร้อมผสมโดยสังเกตจากการที่ดอกมีเกสรเพศผู้สีเหลืองอ่อนและแอ่งเกสรตัวเมียมีเมือกเหนียว ใช้ไม้ปลายเรียวแหลมเขี่ยกลุ่มเรณูให้ตกลงที่แอ่งเกสรเพศเมียของดอกเดียวกันหรือต่างดอกกัน กดเบา ๆ ลงบนแอ่งดังกล่าวเพื่อไม่ให้กลุ่มเรณูเลื่อนหลุดไป แขวนป้ายระบุ วัน เดือน ปี ที่ผสมเกสรไว้ที่ก้านดอกแต่ละดอก

เมื่อได้ฝักที่มีอายุต่าง ๆ ตามระบุไว้ข้างต้นแล้ว นำฝักเหล่านั้นมาผ่านขั้นตอนของการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อโดยการนำฝักแต่ละฝักมา ตัดส่วนที่แห้งบริเวณปลายฝักออก ทำความสะอาดเบื้องต้น โดยล้างด้วยน้ำยาล้างจานและใช้แปรงขัดตามซอกของฝักให้ตลอดฝัก แล้วล้างน้ำให้สะอาด เช็ดด้วย 70 % ethyl alcohol จากนั้นนำไปเขย่าในสารละลายคลอร็อกซ์ 15 % นาน 15 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำฝักไปวางบนจานเพาะเลี้ยงที่มีแผ่นพลาสติกที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ววางอยู่ ใช้มีดกรีดฝักตามขวาง จากนั้นใช้ปลายมีดเขี่ยเมล็ดลงในขวดเพาะซึ่งบรรจุอาหารเหลวสูตร VW ปริมาตร 10 มล เพาะเมล็ดจากฝัก 1 ฝัก ลงในขวดเพาะ 1 ขวด เลี้ยงไว้นาน 1 สัปดาห์ เพื่อให้เมล็ดจมในอาหาร

หลังจากเพาะเลี้ยงเมล็ดได้ 1 สัปดาห์ นำเมล็ดจากขวดเพาะแต่ละขวดหรือแต่ละกรรมวิธีมาหยดลงบนอาหารเหลวขวดใหม่ ขวดละ 5 หยด แล้วนำขวดไปวางไว้บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วประมาณ 100 รอบต่อนาที ในที่มืด

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยมีกรรมวิธีทั้งหมด 6 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 1 เมล็ดจากฝักอายุ 3 สัปดาห์

กรรมวิธีที่ 2 เมล็ดจากฝักอายุ 4 สัปดาห์

กรรมวิธีที่ 3 เมล็ดจากฝักอายุ 5 สัปดาห์

กรรมวิธีที่ 4 เมล็ดจากฝักอายุ 6 สัปดาห์

กรรมวิธีที่ 5 เมล็ดจากฝักอายุ 7 สัปดาห์

กรรมวิธีที่ 6 เมล็ดจากฝักอายุ 8 สัปดาห์

บันทึกความกว้าง และความยาวของเอ็มบริโอ และโปรโตคอร์มซึ่งเกิดจากเมล็ดในแต่ละกรรมวิธี โดยการสุ่มวัด 5 หน่วยต่อซ้ำ ระยะเวลาที่ใช้ในการงอกของเมล็ด และเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved