บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. อุปกรณ์และสารเคมี

1.1 การเก็บรักษาละอองเกสร

1.1.1 ละอองเกสรจากดอกที่บานเต็มที่ของพืชสกุลขมิ้น กลุ่มปทุมมา และกลุ่มกระเจียว 7 สายพันธุ์ คือ

1.1.1.1 ปทุมมาสายพันธุ์ 'Chiang Mai Pink' (CMP)

1.1.1.2 ปทุมมา'เบอร์28' (PT -28)

1.1.1.3 บัวโกเมน (BK)

1.1.1.4 บัวชั้น (BC)

1.1.1.5 กระเจียวสีส้ม (OR)

1.1.1.6 ลูกผสมสายพันธุ์มะเหมี่ยว (MM)

1.1.1.7 ลูกผสมเบอร์38 (K-38)

1.1.2 ตู้เย็น

1.1.3 Compound microscope

1.1.4 ไมโครมิเตอร์

1.1.5 กล้องถ่ายรูป

1.1.6 ซิลิกาเจล

1.1.7 จานเลี้ยงเชื้อ

1.1.8 เข็มเขี่ย

1.1.9 ปากคีบ

1.1.10 ไมโครปิเปตต์ขนาด 200 มิลลิลิตร

1.1.11 แผ่นสไลด์และกระจกปิด

1.1.12 พาลาฟิล์ม

1.1.13 กระดาษซับน้ำ

1.1.14 กล่องพลาสติก

1.1.15 อาหารเหลวเลี้ยงละอองเกสรสูตร Brewbaker and Beyong (1963)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2 การผสมพันธุ์พืชกลุ่มปทุมมา และกลุ่มกระเจียว

1.2.1 พืชกลุ่มปทุมมา และกลุ่มกระเจียว 7 สายพันธุ์ คือ

1.2.1.1 ปทุมมาสายพันธุ์ 'Chiang Mai Pink' (CMP)

1.2.1.2 ปทุมมา 'เบอร์ 28' (PT -28)

1.2.1.3 บัวโกเมน (BK)

1.2.1.4 บัวชั้น (BC)

1.2.1.5 กระเจียวสีส้ม (OR)

1.2.1.6 ลูกผสมสายพันธุ์มะเหมี่ยว (MM)

1.2.1.7 ปทุมมาลูกผสมเบอร์ 38 (K-38)

1.2.2 ไม้จิ้มฟัน

1.2.3 คัตเตอร์

1.2.4 ถุงกระดาษคลุมช่อดอก

1.2.5 ปากคีบความยาว 18 เซนติเมตร

1.2.6 แผ่นป้ายพลาสติก

1.2.7 ลวดสายไฟสำหรับมัดป้ายกรรมวิธี

1.3 การเพาะเลี้ยงคัพภะ

1.3.1 ฝักของปทุมมาลูกผสม

1.3.2 ตู้กรองอากาศบริสุทธิ์ (air flow carbinet)

1.3.3 ชั้นสำหรับวางหลอดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.3.4 เครื่องชั่งชนิดละเอียด (analytical balance)

1.3.5 เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดทศนิยม 3 และ 4 ตำแหน่ง (electrical balance)

1.3.6 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)

1.3.7 หม้อนึ่งความดันไอ

1.3.8 หลอดทดลองขนาด 2.5 × 15.0 เซนติเมตร

1.3.9 ช้อนตักสารเคมี

1.3.10 จานเลี้ยงเชื้อ

1.3.11 เครื่องแก้วอื่นๆ เช่น ปิเปต บีกเกอร์ ขวดรูปชมพูขนาด 125 และ 500 มิลลิลิตร กระบอกวัดปริมาตร แท่งแก้ว ขวดสารละลายเข้มข้น เป็นต้น

1.3.12 วัสดุที่ใช้ในตู้กรองอากาศได้แก่

1.3.12.1 มีดผ่าตัดเบอร์ 10 และ 11

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3.12.2 ใบมีดโกน

1.3.12.3 ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.3.12.4 ปากคีบขนาดความยาว 14 และ 18 เซนติเมตร

1.3.12.5 แผ่นพลาสติกตัดเป็นสี่เหลี่ยมขนาด 7 × 9 เซนติเมตร

1.3.12.6 หลอดทดลองใส่แอลกอฮอล์

1.3.12.7 บีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร

1.3.13 วัสดุอื่นๆ เช่น ยางรัด แผ่นป้ายกรรมวิธี

1.3.14 น้ำกลั่น

1.3.15 อาหารพื้นฐานสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร Murashige and Skoog (MS, 1962)

1.3.16 น้ำตาลซูโครส

1.3.17 ผงวุ้นตราเฮลิคอปเตอร์

1.3.18 Casein hydrolysate

1.3.19 Hydrochloric acid 1 N

1.3.20 Potassium hydroxide 1 N

1.3.21 เอทธานอล 70 เปอร์เซ็นต์

1.3.22 น้ำยาคลอร็อกซ์ของบริษัท The Clorox Co., Oakland, USA.

2. การเตรียมสารละลายเข้มข้น

2.1 การเตรียมอาหารเหลวเลี้ยงละอองเกสร

เตรียมน้ำยาเข้มข้นสูตร Brewbaker and Beyong (1963) โดยใช้ปริมาตรสารดังแสดงในตารางที่ 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 ชนิดและปริมาณสารของน้ำยาเข้มข้นสูตร Brewbaker and Beyong (1963)

ชนิดของสาร	ปริมาณสารในสูตร Brewbaker and Beyong (1963) (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมารสารในน้ำยาเข้มข้น 100 มล (มิลลิกรัม)
H_3BO_3	100	10
$Ca(NO)_2.4H_2O$	1300	130
$MgSO_4.7H_2O$	200	20
KNO_3	100	10

2.2 การเตรียมสารละลาย Fluorescein diacetate (FDA)

เตรียมน้ำยาเข้มข้นของสารละลาย fluorescein diacetate โดยทำละลายใน acetone (2 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร) สามารถเก็บในตู้เย็นได้นาน 1 เดือน

2.3 การเตรียมอาหารพื้นฐานสูตร MS

2.3.1 การเตรียมธาตุอาหารหลัก

เตรียมธาตุอาหารหลักแต่ละชนิดในสูตร MS (1962) โดยผสมสารละลายเข้มข้นไว้ในขวดเดียวกัน มีความเข้มข้นสารละลายเป็น 10 เท่า เตรียมให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำหนักของสารดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ชนิดและปริมาณของสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร MS (1962)

ชนิดของสาร	ปริมาณสารในสูตร MS(1962) (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณสารในสูตรความเข้มข้น 10X (กรัมต่อลิตร)
NH_4NO_3	1650	16.50
KNO_3	1900	19.00
$CaCl_2.2H_2O$	440	4.40
$MgSO_4.7H_2O$	370	3.70
KH_2PO_4	170	1.70

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.2 การเตรียมธาตุอาหารรอง

เตรียมธาตุอาหารรองสูตร MS (1962) โดยผสมสารละลายเข้มข้นไว้ในขวดเดียวกัน มีความเข้มข้นสารละลายเป็น 100 เท่า เตรียมให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำหนักของสารดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ชนิดและปริมาณของสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรองสูตร MS (1962)

ชนิดของสาร	ปริมาณสารในสูตร MS(1962) (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณสารในสูตรความเข้มข้น 100X (มิลลิกรัมต่อลิตร)
$CuSO_4.5H_2O$	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
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	2.5

2.3.3 การเตรียมสารประกอบอินทรีย์

เตรียมวิตามินในสูตร MS (1962) ที่เติม glycine และ myo-inositol โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน ความเข้มข้นสารละลายเป็น 100 เท่า เตรียมให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 มล โดยใช้น้ำหนักของสารดังแสดงในตารางที่ 4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4 ชนิดและปริมาณของสารละลายเข้มข้นของสารประกอบอินทรีย์สูตร MS (1962)

ชนิดของสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณสารในสูตรความเข้มข้น 100X (มิลลิกรัมต่อลิตร)
Glycine	2.00	200
Myo-inositol	100.00	10000
Thiamine.HCl	0.25	25
Pyridoxine.HCl	0.25	25
Nicotinic acid	0.25	25

2.3.4 การเตรียมสารละลายเหล็ก FeEDTA

เตรียม FeEDTA ในสูตร MS (1962) ซึ่งประกอยด้วย $FeSO_4.H_2O$ และ $Na_2EDTA.2H_2O$ โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน ความเข้มข้นสารละลายเป็น 100 เท่า โดยทำการชั่งสารแต่ละชนิดแล้วแยกละลายในน้ำที่มีปริมาตรสุดท้ายชนิดละ 500 มิลลิลิตร หลังจากนั้นจึงนำมาผสมกันในขวดที่ทึบแสง โดยใช้น้ำหนักของสารดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ชนิดและปริมาณของสารละลายเข้มข้นของเหล็กสูตร MS (1962)

ชนิดของสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณสารในสูตรความเข้มข้น 100X (กรัมต่อลิตร)
$FeSO_4.7H_2O$	27.8	2.78
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.3	3.73

3. การเตรียมอาหาร

3.1 น้ำยาเฉลี่ยละอองเกสร

นำน้ำยาเข้มข้นสูตร Brewbaker and Beyong (1963) ที่เตรียมจากในข้อ 2.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมน้ำตาล 0.5 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตร นำไปใส่ไว้ในขวดทึบแสง แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 การเตรียมอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962)

ใส่น้ำกลั่นลงไปในขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 1000 มิลลิลิตร ประมาณ หนึ่งในสามของขวดแล้วเติมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง วิตามิน เหล็ก ส่วน casein hydrolysate และน้ำตาลซูโครสปรับตามกรรมวิธี ซึ่งละลายในน้ำกลั่นแล้วลงไปตามลำดับ ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 มิลลิลิตร (กรณีอาหารปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 มิลลิลิตร) ดังแสดงในตารางที่ 6 เทลงในบีกเกอร์ปริมาตร 2000 มิลลิลิตร แล้วนำไปปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ค่า pH 5.7 แล้วจึงเติมผงวุ้นลงไป นำไปต้มให้ผงวุ้นละลายจนหมด แบ่งอาหารที่เตรียมลงในหลอดทดลอง หลอดละ 10 มิลลิลิตร ปิดหุ้มปากหลอดด้วยพลาสติกทนร้อน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องสาเซลเซียส นาน 15 นาที

ตารางที่ 6 ส่วนผสมสำหรับการเตรียมอาหารสูตร MS (1962)

ชนิดของสารละลาย	ปริมาตรของสารละลายในอาหาร 1000 มิลลิลิตร (มิลลิลิตร)
ธาตุอาหารหลัก (10X)	100
ธาตุอาหารรอง (100X)	10
สารประกอบอินทรีย์ (100X)	10
สารละลายเหล็ก (100X)	10
Casein hydrolysate	*
น้ำตาลซูโครส	*
ผงวุ้น	8 กรัม

* หมายถึง ปริมาณที่ใช้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นในแต่ละกรรมวิธีของการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. วิธีการวิจัย

4.1 การทดลองที่ 1 การงอกของละอองเกสรของพืชกลุ่มปทุมมา และกลุ่มกระเจียวที่เก็บรักษาในสภาพต่างกัน

4.1.1 การทดลองที่ 1.1 การเก็บรักษาละอองเกสรปทุมมาในสภาพต่างกัน

เก็บละอองเกสรของปทุมมาพันธุ์ 'Chaing Mai Pink' (ซึ่งมีลักษณะตามธรรมชาติไม่แห้งเป็นผง) โดยเก็บระยะการบานที่อับเกสรแก่เต็มที่แล้ว เก็บรักษาในจานเลี้ยงเชื้อที่สภาพแตกต่างกัน 3 สภาพ ได้แก่ สภาพแห้งโดยวางบนจานแก้วโดยตรง ใช้พาราฟิล์มปิดขอบจานแก้ว สภาพที่สองสภาพแห้งโดยวางบนจานแก้วที่วางบนสารดูดความชื้นคือ ซิลิกาเจล และสภาพที่สามคือ เก็บในจานแก้วบนกระดาษกรองที่ใส่น้ำกลั่นพอชื้น ร่วมกับการเก็บในอุณหภูมิห้องและในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงละอองเกสร บันทึกความมีชีวิตและความงอกเมื่อเก็บเป็นเวลา 0 1 3 6 10 15 21 และ 28 วัน วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ กรรมวิธีละ 3 ซ้ำใช้อับละอองเกสร 1 อันต่อ 1 ซ้ำ

บันทึกผลการทดลองดังนี้

1. เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของละอองเกสร
2. เปอร์เซ็นต์ความงอกของละอองเกสร
3. ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของละอองเกสร

4.1.2 การทดลองที่ 1.2 เปรียบเทียบการงอกของละอองเกสรพืชกลุ่มปทุมมา และกลุ่มกระเจียวที่ใช้ทำการผสม

เก็บตัวอย่างอับละอองเกสรของพืชกลุ่มกระเจียว 7 สายพันธุ์ คือ ปทุมมาสายพันธุ์ 'Chiang Mai Pink' ปทุมมา 'เบอร์ 28' บัวโกเมน บัวชั้น กระเจียวสีส้ม ลูกผสมสายพันธุ์มะเหมียว และลูกผสมเบอร์ 38 โดยเก็บละอองเกสรในสภาพที่ดีที่สุดจากผลการทดลองที่ 1.1 แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวซึ่งใช้เพาะเลี้ยงละอองเกสร การบันทึกผลการทดลองทำโดยบันทึกความงอกเมื่อเก็บเป็นเวลา 0 1 3 6 10 15 21 และ 28 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ โดยใช้อับละอองเกสร 1 อันต่อ 1 ซ้ำ

บันทึกผลการทดลองดังนี้

1. เปอร์เซ็นต์ความงอกของละอองเกสร
2. ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของละอองเกสร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2 การทดลองที่ 2 การผสมพันธุ์ระหว่างชนิดและระหว่างต้น

ก่อนทำการผสม 1 วันต้องเตรียมต้น ที่จะทำการผสมเกสรก่อน โดยใช้ปากคีบดึงดอกอ่อนในซอกใบประดับออกให้เหลือแต่ดอกตูมเต็มที่ที่พร้อมบานในเช้าวันถัดไป 1 ดอก แล้วนำถุงกระดาษคลุมช่อดอกไว้ เพื่อป้องกันการผสมข้ามก่อนที่จะทำการทดลองผสมเกสร ทำการผสมเกสรโดยใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยละอองเกสรจากดอกที่บานเต็มที่ แล้วนำไปแตะบนยอดเกสรตัวเมีย แล้วทำเครื่องหมายดอกที่ได้รับการผสมโดยใช้คัตเตอร์กรีดใบประดับให้เป็นรอยแล้ว นำป้ายกรรมวิธีมาผูกติดกับติดกับช่อดอกที่ได้รับการผสมผสมเกสร ทำการผสมในช่วงเวลา 6.00 ถึง 10.00 นาฬิกา

ศึกษาความเป็นไปได้ในการผสมพันธุ์พืชทดลองแต่ละคู่ แบบผสมตัวเอง และสลับพ่อแม่ ดังตารางที่ 7 รวมทั้งหมด 17 คู่ผสม ทำการผสมคู่ผสมละ 10 ดอก (ซ้ำ)

ตารางที่ 7 แสดงการจับคู่ผสมของพืชกลุ่มปทุมมา และกลุ่มกระเจียว

แม่พันธุ์ / พ่อพันธุ์	C-28	CMP	BK	BC	OR	MM	K-38
C-28	C-28 × C-28	CMP × C-28			OR × C-28	MM × C-28	K-38 × C-28
CMP	C-28 × CMP		BK × CMP	BC × CMP			K-38 × CMP
BK		CMP × BK					
BC		CMP × BC					
OR	C-28 × OR				OR × OR		
MM	C-28 × MM					MM × MM	
K- 38	C-28 × K-38	CMP × K38					

* C-28 = ปทุมมา "เบอร์ 28" CMP = ปทุมมา 'Chiang Mai Pink' BK = บัวโกเมน BC = บัวชั้น OR = กระเจียวสีส้ม MM= ลูกผสมสายพันธุ์มะเหมี่ยว K-38 = ปทุมมาลูกผสมเบอร์ 38

บันทึกผลการทดลองดังนี้

1. บันทึกเปอร์เซ็นต์การติดฝัก ในแต่ละสัปดาห์
2. บันทึกจำนวนเมล็ดต่อฝัก
3. ศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3 การทดลองที่ 3 การเลี้ยงคัพภะ

การทดลองนี้เป็นการศึกษาเพื่อเตรียมข้อมูลไว้สำหรับเลี้ยงคัพภะอ่อน โดยนำคู่ผสมปทุมมาพันธุ์ 'Chiang Mai Pink' กับปทุมมาสายพันธุ์ต่างๆ แบบสลับพ่อแม่ไปเลี้ยงในสภาพหลอดแก้ว เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีความจำเป็นต่อการเจริญและพัฒนาของคัพภะต่อไป โดยแบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อย

4.3.1 การทดลองที่ 3.1 ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส และอายุคัพภะต่อการงอกของคัพภะและการเจริญของต้นกล้า

นำฝักคู่ผสม CMP × PT ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งในสภาพปลอดเชื้อ แกะเอาเมล็ดออกมาจากฝัก แล้วผ่าเมล็ดตามยาวออกเป็น 2 ส่วนค่อยๆ แยกคัพภะข้างในออกมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ โดยมีปัจจัยทดลอง 2 ปัจจัย คือ น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3 6 9 และ 12 เปอร์เซ็นต์ โดยทดลองร่วมกับอายุของคัภพะที่ 24 27 และ 30 วันหลังจากการผสมเกสร รวม 12 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ

บันทึกผลการทดลองดังนี้

1. บันทึกเปอร์เซ็นต์ความงอก
2. บันทึกการเจริญเติบโตของต้นกล้า
3. บันทึกคุณภาพของคัพภะที่เลี้ยง

4.3.2 การทดลองที่ 3.2 ความเข้มข้นของ casein hydrolysate และอายุคัพภะ ต่อการงอกของคัพภะและการเจริญของต้นกล้า

นำฝักลูกผสม CMP × PT ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ฟอกฆ่าเชื้อด้วย คลอร็อกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งในสภาพปลอดเชื้อ แกะเอาเมล็ดออกมาจากฝัก แล้วผ่าเมล็ดตามยาวออกเป็น 2 ส่วน แล้วค่อยๆ แยกคัพภะข้างในออกมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ โดยมีปัจจัยทดลอง 2 ปัจจัย คือ casein hydrolysate ที่ความเข้มข้นต่างกัน 4 ระดับ คือ 0 250 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทดลองร่วมกับอายุของคัพภะที่ 24 27 และ 30 วันหลังจากการผสมเกสร รวม 12 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บันทึกผลการทดลองดังนี้

1. บันทึกความงอก
2. บันทึกการเจริญเติบโตของต้นกล้า
3. บันทึกคุณภาพของคัพภะที่เลี้ยง

4.3.3 การทดลองที่ 3.3 ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส และอายุคัพภะที่มีรกติดอยู่ต่อการงอกและเจริญเติบโตของคัพภะ

นำฝักลูกผสม CMP × PT ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วเช็ดด้วยแอลกอฮอร์ 70 เปอร์เซ็นต์ ใช้ใบมีดเบอร์ 10 แกะผิวฝักออกในที่ปิดไม่มีลมป้องกันคัพภะแห้ง นำคัพภะที่ติดกับรกไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งในสภาพปลอดเชื้อ แล้วในไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ โดยมีปัจจัยทดลอง 2 ปัจจัย คือ น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3 6 และ 9 เปอร์เซ็นต์ โดยทดลองร่วมกับอายุของคัพภะอ่อนที่มีรกติดอยู่อายุ 3 6 9 และ 12 วันหลังจากการผสมเกสร รวม 12 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ

บันทึกผลการทดลองดังนี้

1. บันทึกการเจริญเติบโตของคัพภะอ่อน
2. บันทึกการเกิดแคลลัส
3. บันทึกคุณภาพของคัพภะอ่อนที่เลี้ยง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved