บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาการขยายพันธุ์เอื้องน้ำต้นในสภาพปลอดเชื้อ ประกอบด้วยการทดลอง 4 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 **โครงสร้างของเอื้องน้ำต้น** การทดลองที่ 2 **การเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ** การทดลองที่ 3 **ผลของสูตรอาหารต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณู** และ การทดลองที่ 4 **ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต** อุปกรณ์และวิธีการในแต่ละการทดลองมีดังต่อไปนี้

การทดลองที่ 1 โครงสร้างของเอื้องน้ำต้น

การทดลองนี้มี 2 การทดลองย่อย คือ **การศึกษาสัณฐานวิทยาของเอื้องน้ำต้น** และ **การศึกษากายวิภาคศาสตร์ของชิ้นส่วนที่นำไปเพาะเลี้ยง** อุปกรณ์และวิธีการทดลองมีดังนี้

1.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาของเอื้องน้ำต้น

1.1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.1.1.1 พืชทดลองคือ ต้นเอื้องน้ำต้นที่อยู่ในระยะที่เจริญเติบโตเต็มที่

1.1.1.2 อุปกรณ์ ได้แก่ สมุด ดินสอ ไม้บรรทัด มีดผ่าตัด ปากคีบ และกระดาษสำหรับวาดภาพ

1.1.2 วิธีการทดลอง

1.1.2.1 บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของส่วนประกอบของต้นพืช ได้แก่ หัว ใบ ดอก และฝัก พร้อมทั้งวาดภาพทางพฤกษศาสตร์แสดงลักษณะของส่วนประกอบเหล่านั้นโดยละเอียด

1.1.2.2 บันทึกจำนวนและขนาดของส่วนประกอบของต้น จากต้นพืชตัวอย่าง 5 ต้น ดังนี้

1.1.2.2.1 **หัว** จำนวนหัวต่อต้น ขนาดของหัว จำนวนข้อและปล้องของหัว และ จำนวนสันของสันหัว

1.1.2.2.2 **ใบ** จำนวนใบต่อต้น และขนาดของใบที่ 3 จากโคนต้น

1.1.2.2.3 **ช่อดอก** ขนาดของช่อดอกและจำนวนดอกต่อช่อ

1.1.2.2.4 **ดอก** ขนาดของดอก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1.2.2.5 **ฝัก** ขนาดของฝัก

1.2 การศึกษากายวิภาคศาสตร์ของชิ้นส่วนที่นำไปเพาะเลี้ยง

1.2.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.2.1.1 วัสดุทดลอง คือ เนื้อเยื่อของใบ ก้านช่อดอก และปลายยอด ของเอื้องน้ำต้น

1.2.1.2 อุปกรณ์

1.2.1.2.1 เครื่องตัดชิ้นส่วนพืชแบบล้อหมุน

1.2.1.2.2 ตู้อบที่ปรับอุณหภูมิเป็น 56 ° ซ โดยประมาณ

1.2.1.2.3 กล้องจุลทรรศน์แบบ dissecting microscope และ stereo microscope พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

1.2.1.2.4 แผ่นให้ความร้อน

1.2.1.2.5 เครื่องอุ่นสไลด์ที่ปรับอุณหภูมิเป็น 40 ° ซ โดยประมาณ

1.2.1.2.6 แท่งไม้สี่เหลี่ยมขนาด 1.5 × 1.5 × 1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่อิ่มตัวในพาราฟิน

1.2.1.2.7 แผ่นกระจกสไลด์ (slide) และแผ่นกระจกปิดสไลด์ (cover slip)

1.2.1.2.8 อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดใส่ชิ้นส่วนพืช บีกเกอร์ และ ขวดย้อมสี

1.2.1.2.9 อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ ตะเกียงแอลกอฮอล์ มีดผ่าตัด ปากคีบ ป้ายติดกาว และ พู่กันขนอ่อน

1.2.1.3 สารเคมี

1.2.1.3.1 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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.1.3.2 น้ำยาสำหรับดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution) ประกอบด้วยส่วนผสมดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนผสมของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์

ขั้นตอน	ปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำยา (%)	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	-

1.2.1.3.3 สารตัวกลางที่ใช้ในการฝังเนื้อเยื่อเพื่อการตัดชิ้นส่วนของพืชทดลอง ได้แก่ Paraplast

1.2.1.3.4 น้ำยายึดเนื้อเยื่อพืชให้ติดแผ่นสไลด์ (adhesive)

เตรียมน้ำยาเข้มข้นจากส่วนผสมของ ไข่ขาว 1 มล และน้ำกลั่น 49 มล เมื่อจะใช้จึงนำน้ำยาเข้มข้นมาเจือจาง โดยใช้น้ำยาเข้มข้น 1 มล มาเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวมเป็น 50 มล

1.2.1.3.5 น้ำยาทำให้เนื้อเยื่อสะอาด (clearing reagent) คือ xylene

1.2.1.3.6 สีย้อมเนื้อเยื่อใช้สี Delafield's hematoxylin ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมดังนี้

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.1.3.7 สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นสไลด์ (mounting media) คือ Canada balsam

1.2.2 วิธีการ

ศึกษาเนื้อเยื่อของวัสดุทดลอง โดยศึกษาจากเนื้อเยื่อที่ตัดตามขวางและตามยาว ตามวิธีการศึกษาเนื้อเยื่อแบบ paraffin embedding ที่บรรยายไว้โดย Johansen (1940) โดยการเตรียมเนื้อเยื่อให้อยู่ในลักษณะของเนื้อเยื่อในสไลด์ถาวร มีขั้นตอนของการดำเนินการดังนี้

1.2.2.1 เก็บตัวอย่างของใบ ก้านช่อดอก และปลายยอด มาแช่ใน FAA เพื่อหยุดการทำงานของเซลล์และรักษาสภาพเซล

1.2.1.2 ดึงน้ำออกจากเซลล์ของเนื้อเยื่อ ด้วยน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยการผ่านเนื้อเยื่อลงไปในน้ำยา 5 ระดับเป็นขั้นตอนไป แล้วให้เนื้อเยื่ออยู่ในน้ำยาในแต่ละขั้นตอนนาน 6-12 ชั่วโมง จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปแช่ใน TBA นาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงถ่ายลงไปแช่ในน้ำยาที่มีส่วนผสมของ TBA และพาราฟินเหลว ในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเป็นอย่างต่ำ ต่อจากนั้นนำเนื้อเยื่อไปผ่านขั้นตอนของการแทรกพาราฟินเข้าไปในเนื้อเยื่อ

1.2.1.3 นำเนื้อเยื่อไปแช่ใน Paraplast ที่หลอมไว้ในขวดแก้วขนาดเล็ก นำไปเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 56 ° ซ นานประมาณ 1 สัปดาห์หรือมากกว่า จนกระทั่งพาราฟินแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อเต็มที่ เมื่อพร้อมที่จะตัดเนื้อเยื่อจึงนำไปฝังใน Paraplast เพื่อการตัดเนื้อเยื่อต่อไป

1.2.1.4 ตัดชิ้นส่วนพืชโดยใช้เครื่องตัดชิ้นส่วนแบบล้อหมุน ตัดตามยาวหรือขวางตามความเหมาะสม โดยให้ชิ้นส่วนมีความหนา 13-15 ไมครอน

1.2.1.5 นำแถบของชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชที่ตัดได้ มาติดบนแผ่นกระจกสไลด์ ด้วยน้ำยายึดเนื้อเยื่อพืชให้ติดกับแผ่นกระจกสไลด์ วางแผ่นกระจกสไลด์บนเครื่องอุ่นสไลด์จนแห้งและติดแน่นกับแผ่นกระจกสไลด์

1.2.1.6 นำกระจกสไลด์ที่ติดแถบของชิ้นส่วนแล้วนั้นไปละลาย Paraplast ออกจากเนื้อเยื่อและทำความสะอาดเนื้อเยื่อ โดยแช่ใน xyleneแล้วย้อมด้วยสี Delafield's hematoxylin ปิดกระจกสไลด์โดยใช้ Canada balsam ยึด

1.2.1.7 เมื่อแผ่นกระจกสไลด์แห้งสนิท จึงนำไปศึกษาเนื้อเยื่อ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 การเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ

การทดลองนี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อย คือ **ผลของอายุฝักต่อการงอกของเมล็ด** และ **ผลของ NAA และ BA ต่อการงอกของเมล็ด** การทดลองทั้ง 2 มีอุปกรณ์และวิธีการทดลองดังนี้

2.1 ผลของอายุฝักต่อการงอกของเมล็ด

2.1.1 วัสดุทดลอง คือ ฝักของเอื้องน้ำต้นที่มีอายุต่างกัน 5 กรรมวิธี คือ อายุ 2, 4, 6, 8 และ 10 สัปดาห์

2.1.2 อุปกรณ์และวิธีการในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทดลอง

2.1.2.1 อุปกรณ์และการเตรียมอาหารในสูตรอาหารหลักและอาหารรอง

2.1.2.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่

2.1.2.1.1.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบหยาบและละเอียด

2.1.2.1.1.2 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง

2.1.2.1.1.3 หม้อนึ่งความดัน

2.1.2.1.1.4 ตู้กรองอากาศ (air flow cabinet)

2.1.2.1.1.5 เตาไมโครเวฟ

2.1.2.1.1.6 หลอดทดลองขนาด 25 × 150 มม

2.1.2.1.1.7 ขวดวัดปริมาตร

2.1.2.1.1.8 กระบอกวัดปริมาตร

2.1.2.1.1.9 ขวดใส่สารละลายเข้มข้น

2.1.2.1.1.10 ช้อนตักสาร

2.1.2.1.1.11 แท่งแก้วคนสารเคมี

2.1.2.1.1.12 กรวยแก้ว

2.1.2.1.1.13 หลอดหยด

2.1.2.1.1.14 ขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มล

2.1.2.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในตู้กรองอากาศ

2.1.2.1.2.1 ด้ามมีดผ่าตัด เบอร์ 3

2.1.2.1.2.2 ใบมีดผ่าตัด เบอร์ 10 และ 11

2.1.2.1.2.3 ปากคีบ

2.1.2.1.2.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.2.1.2.5 จานเพาะเชื้อที่ใส่พลาสติกสำหรับรองตัด

2.1.2.1.2.6 จานเพาะเชื้อ

2.1.2.1.2.7 หลอดสำหรับใส่แอลกอฮอล์

2.1.2.1.3 สารเคมี

2.1.2.1.3.1 สารที่ใช้สำหรับทำความสะอาดและฟอกฆ่าเชื้อ

2.1.2.1.3.1.1 น้ำยาล้างจาน

2.1.2.1.3.1.2 70% ethyl alcohol

2.1.2.1.3.1.3 Tween 20

2.1.2.1.3.1.4 คลอร๊อกซ์

2.1.2.1.3.1.5 สารละลาย Strepto

2.1.2.1.3.2 สารที่ใช้สำหรับเตรียมอาหาร

2.1.2.1.3.2.1 ในการเตรียมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักของสูตร Vacin and Went (1949) ดัดแปลง หรือ VW (CMU1) นั้นได้เตรียมสารละลายเข้มข้นรวมให้มีความเข้มข้นมากกว่าสูตรมาตรฐาน 20 เท่าของปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล ซึ่งใช้ชนิดและปริมาณของสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ชนิดและปริมาณของสารที่เป็นส่วนประกอบในการเตรียมธาตุอาหารหลักสูตร VW (CMU1)

ชนิด	ปริมาณในสูตรมาตรฐาน (มก/ล)	ปริมาณในสูตรเข้มข้น 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

2.1.2.1.3.2.2 ในการเตรียมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร Murashige and Skoog (1962) หรือ MS นั้นได้เตรียมสารละลายเข้มข้นรวมให้มี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความเข้มข้นมากกว่าสูตรมาตรฐาน 20 เท่าของปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล ซึ่งใช้ชนิดและปริมาณของสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ชนิดและปริมาณของสารที่เป็นส่วนประกอบในการเตรียมธาตุอาหารหลักสูตร MS

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

2.1.2.1.3.2.3 ในการเตรียมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรองสูตร Murashige and Skoog (1962) หรือ MS นั้นใช้วิธีการเตรียมให้เป็นสารละลายเข้มข้นรวม โดยให้มีความเข้มข้นเป็น 100 เท่า ของสูตรมาตรฐานในปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล ชนิดและปริมาณของสารเคมีชนิดต่าง ๆ แสดงไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ชนิดและปริมาณของสารเคมีในอาหารรองสูตร MS

ชนิด	ปริมาณในสูตรมาตรฐาน (มก/ล)	ปริมาณในสูตรเข้มข้น100เท่า (มก/ล)
$MnSO_4.4H_2O$	22.330	2,230.0
$ZnSO_4.7H_2O$	8.600	860.0
H_3BO_3	6.200	620.0
KI	0.830	83.0
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.250	25.0
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	2.5
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	2.5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.2.1.3.2.4 การเตรียมสารละลายเหล็กในรูป FeEDTA ในสูตร MS นั้นสารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบคือ $FeSO_4.7H_2O$ และ Na_2EDTA โดยเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้นรวมให้มีความเข้มข้นเป็น 100 เท่าในปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล สารแต่ละชนิดอยู่ในรูปของสารละลายในปริมาตรสุดท้าย 500 มล ซึ่งต้องมาเทรวมกันเก็บไว้ในขวดสีชากันแสง สารเคมีที่ใช้มีปริมาณดังแสดงในตาราง ที่ 5

ตารางที่ 5 ชนิดและปริมาณของสารเคมีในสารละลายเหล็กสูตร MS

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

2.1.2.1.3.2.5 การเตรียมอินทรีย์สาร ที่ประกอบด้วยวิตามินชนิด glycine และ myo - inositol ใช้วิธีการเตรียมให้เป็นสารละลายเข้มข้นรวมที่มีความเข้มข้นของสารเป็น 100 เท่าในปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล สารเคมีที่ใช้มีชนิดและปริมาณ ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ชนิดและปริมาณของสารเคมีในสารละลายเข้มข้นของอินทรีย์สารสูตร MS

ชนิด	ปริมาณในสูตรมาตรฐาน (มก/ล)	ปริมาณในสารละลายเข้มข้น 100 เท่า (มก/ล)
Myo - inositol	1,000.00	10,000
Glycine	2.00	200
Thiamine.HCl	0.25	25
Pyridoxin.HCl	0.25	25
Nicotinic acid	0.25	25

2.1.2.1.3.2.6 น้ำมะพร้าว

2.1.2.1.3.2.7 ผงวุ้นตราเฮลิคอปเตอร์

2.1.2.1.3.2.8 น้ำตาลซูโครส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.3 วิธีการ

2.1.3.1 เตรียมอาหารแข็งสูตร VW (CMU1) ตามวิธีการที่บรรยายไว้ดังภาคผนวกที่ 1 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design : CRD) มีกรรมวิธีรวมทั้งหมด 5 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ฝักอายุ 2 สัปดาห์
กรรมวิธีที่ 2 ฝักอายุ 4 สัปดาห์
กรรมวิธีที่ 3 ฝักอายุ 6 สัปดาห์
กรรมวิธีที่ 4 ฝักอายุ 8 สัปดาห์
กรรมวิธีที่ 5 ฝักอายุ 10 สัปดาห์

2.1.3.2 วิธีการเตรียมฝักอ่อน

นำฝักอ่อนที่มีอายุแตกต่างกันโดยนับจากวันที่ดอกได้รับการผสมเกสรด้วยมือ กรรมวิธีของอายุฝักอ่อนคือ 2, 4, 6, 8 และ 10 สัปดาห์ เมล็ดที่นำมาเพาะในแต่ละกรรมวิธีได้จากฝักที่มีอายุเท่ากัน 2 ฝัก เตรียมฝักเพื่อการเพาะโดยการทำความสะอาดฝักทั้งหมดด้วยน้ำยาล้างจาน จากนั้นล้างให้สะอาดด้วยน้ำ แล้วเช็ดด้วย ethyl alcohol 70% ก่อนนำมาฟอกในสารละลายคลอร็อกซ์ 15% ที่เติม Tween 20 เขย่าเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำเข้าตู้กรองอากาศ ล้างด้วยน้ำกลั่นซึ่งนึ่งฆ่าเชื้อแล้วอีก 3 ครั้ง นำฝักวางบนจานเพาะเชื้อที่มีพลาสติกที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใช้มีดกรีดฝักตามแนวขวางออกเป็นสองส่วน แล้วใช้ปลายมีดค่อย ๆ เขี่ยเมล็ดลงในขวดลูกชมพู่ที่บรรจุน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 10 มล เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน จากนั้นใช้หลอดหยดดูดเมล็ด หยดเมล็ดที่แขวนลอยในน้ำกลั่นของแต่ละกรรมวิธีลงในหลอดทดลองหลอดละ 1 หยด จากนั้นนำหลอดเพาะเลี้ยงทั้งหมดไปเก็บไว้ในที่มืด

2.1.4 บันทึกผลการทดลอง ในแง่ของระยะเวลาที่ใช้ในการงอกของเมล็ด รวมทั้งเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด

2.2 ผลของ NAA และ BA ต่อการงอกของเมล็ด

2.2.1 วัสดุทดลอง คือ เมล็ดของเอื้องน้ำต้นที่ได้จากฝักที่มีอายุ 10 สัปดาห์

2.2.2 อุปกรณ์และวิธีการในการเพาะเลี้ยงวัสดุทดลอง

2.2.2.1 อุปกรณ์

2.2.2.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเมล็ด ใช้อุปกรณ์เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1 ข้อ 2.1.2.1.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.2.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในตู้กรองอากาศ ใช้อุปกรณ์เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1 ข้อ 2.1.2.1.2

2.2.2.2 สารเคมี

2.2.2.2.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับทำความสะอาดและฟอกฆ่าเชื้อและสารที่ใช้สำหรับเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงใช้เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1 ข้อ 2.1.2.1.3.1 และ ข้อ 2.1.2.1.3.2 ตามลำดับ

2.2.2.2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช คือ NAA และ BA

2.2.3 วิธีการ

2.2.3.1 การเตรียมอาหารเหลวสูตร VW (CMU1) ตามวิธีการที่บรรยายไว้ในภาคผนวกที่ 2 ในอาหารเหลวนี้ มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด คือ NAA เข้มข้น 4 ระดับ คือ 0, 0.1, 1 และ 2 มก/ล และ BA เข้มข้น 3 ระดับ คือ 0, 1 และ 2 มก/ล วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) มีกรรมวิธีรวมทั้งหมด 12 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 NAA 0 มล/ล + BA 0 มล/ล
กรรมวิธีที่ 2 NAA 0.1 มล/ล + BA 0 มล/ล
กรรมวิธีที่ 3 NAA 1 มล/ล + BA 0 มล/ล
กรรมวิธีที่ 4 NAA 2 มล/ล + BA 0 มล/ล
กรรมวิธีที่ 5 NAA 0 มล/ล + BA 1 มล/ล
กรรมวิธีที่ 6 NAA 0.1 มล/ล + BA 1 มล/ล
กรรมวิธีที่ 7 NAA 1 มล/ล + BA 1 มล/ล
กรรมวิธีที่ 8 NAA 2 มล/ล + BA 1 มล/ล
กรรมวิธีที่ 9 NAA 0 มล/ล + BA 2 มล/ล
กรรมวิธีที่ 10 NAA 0.1 มล/ล + BA 2 มล/ล
กรรมวิธีที่ 11 NAA 1 มล/ล + BA 2 มล/ล
กรรมวิธีที่ 12 NAA 2 มล/ล + BA 2 มล/ล

2.2.3.2 การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต ดังภาคผนวกที่ 12

2.2.3.3 การเตรียมเมล็ดจากฝักอ่อนและวิธีการเพาะเมล็ดลงในอาหารใช้วิธีการเช่นเดียวกันกับข้อ 2.1.3.2 แต่ฝักอ่อนที่ใช้มีเพียงฝักที่มีอายุ 10 สัปดาห์เท่านั้น และ ใช้เมล็ดจากฝัก 3 ฝัก เพาะในอาหารเหลวสูตร VW (CMU1) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิดคือ NAA และ BA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ดังระบุในข้อ 2.2.3.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.4 การบันทึกผล

2.2.4.1 บันทึกการเปลี่ยนแปลงของเมล็ดตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง

2.2.4.2 บันทึกระยะเวลาที่ใช้ในการงอก และ เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด

2.2.4.3 วัดขนาดความกว้างและความยาวของเอมบริโอ และ โปรโตคอร์ม โดยการวัดจากเมล็ดจำนวน 3 เมล็ดต่อซ้ำ และ วัดขนาดใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ส่องกลับ

การทดลองที่ 3 ผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณู

การทดลองนี้เป็นการศึกษาผลที่มีต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูของเอื้องน้ำต้นของสูตรอาหาร 2 สูตร VW (CMU1) และสูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต 3 ชนิดคือ NAA 2 มล/ล, BA 1 มล/ล และ 2, 4-D ที่ความเข้มข้น 2 และ 4 มล/ล โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อย อุปกรณ์ และ วิธีการทดลองของการทดลองย่อยทั้ง 2 มีดังนี้

3.1 ผลของสูตรอาหาร VW (CMU1) ร่วมกับ NAA, BA และ 2, 4-D

3.1.1 วัสดุทดลอง คือ อับเรณูขนาด 0.05× 0.05 ซม

3.1.2 อุปกรณ์และวิธีการในการเพาะเลี้ยง

3.1.2.1 อุปกรณ์

3.1.2.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยง ใช้อุปกรณ์เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1 ข้อ 2.1.2.1.1

3.1.2.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในตู้กรองอากาศ ใช้อุปกรณ์เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1 ข้อ 2.1.2.1.2

3.1.2.2 สารเคมี

3.1.2.2.1 สีย้อม Orcein

3.1.2.2.2 สารที่ใช้สำหรับทำความสะอาดและฟอกฆ่าเชื้อดอกตูมใช้เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1 ข้อ 2.1.2.1.3.1

3.1.2.2.3 สารที่ใช้สำหรับเตรียมอาหาร ใช้เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1 ข้อ 2.1.2.1.3.2

3.1.2.2.4 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช คือ NAA, BA และ 2, 4-D

3.1.3 วิธีการ

3.1.3.1 การเตรียมอาหารเพื่อเลี้ยงอับเรณูทำโดย เตรียมอาหารแข็งสูตร VW (CMU1) ตามวิธีการที่บรรยายไว้ในภาคผนวกที่ 4 แล้วเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 3 ชนิด คือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

NAA, BA และ 2, 4-D ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือ NAA ที่ความเข้มข้น 2 มล/ล BA ที่ความเข้มข้น 1 มล/ล และ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0, 2 และ 4 มล/ล วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ มีกรรมวิธีรวมทั้งหมด 6 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ โดยมีกรรมวิธีต่างๆ ดังต่อไปนี้

กรรมวิธีที่ 1 NAA 2 มล/ล + BA 1 มล/ล + 2,4-D 0 มล/ล
กรรมวิธีที่ 2 NAA 2 มล/ล + BA 1 มล/ล + 2,4-D 2 มล/ล
กรรมวิธีที่ 3 NAA 2 มล/ล + BA 1 มล/ล + 2,4-D 4 มล/ล
กรรมวิธีที่ 4 NAA 2 มล/ล + BA 1 มล/ล + 2,4-D 0 มล/ล
กรรมวิธีที่ 5 NAA 2 มล/ล + BA 1 มล/ล + 2,4-D 2 มล/ล
กรรมวิธีที่ 6 NAA 2 มล/ล + BA 1 มล/ล + 2,4-D 4 มล/ล

3.1.3.2 การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต ดังแสดงไว้ในภาคผนวกที่ 12

3.1.3.3 การเตรียมวัสดุทดลอง

3.1.3.3.1 ตรวจสอบระยะการเจริญของอับเรณู เตรียมโดยนำดอกตูม มาวัดขนาดดอกแต่ละดอก จากนั้นใช้มีดกรีดกลีบดอกให้เหลือแต่เส้าเกสรแล้วใช้ปากคีบคีบเอาอับเรณูที่อยู่ข้างในดอก มาวางบนแผ่นสไลด์ แล้วหยดสีย้อม orcein ลงไป 1-2 หยด จากนั้นขยี้อับเรณูให้ละเอียด ทิ้งไว้นาน 2-5 นาที ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วนำไปตรวจสอบ และ คัดเลือกขนาดด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างขนาด และ ระยะการเจริญของละอองเกสรให้อยู่ระยะ uninucleate

3.1.3.3.2 ขั้นตอนการเตรียมอับเรณู นำดอกตูม 3 ขนาดที่ได้จากการคัดเลือกในข้อ3.1.3.3.1 ทำความสะอาดดอกตูมด้วยน้ำยาล้างจาน โดยใช้แปรงขนอ่อนถูเบาๆ เนื่องจากดอกของน้ำต้นมีขนปกคลุมไปทั่วทั้งดอก จากนั้นล้างน้ำให้สะอาด นำดอกตูมทั้ง 3 ขนาดไปฟอกฆ่าเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ เขย่าในสารละลาย ethyl alcohol 70% นาน 5 นาที ก่อนนำมาฟอกในสารละลายคลอร็อกซ์ 15% ที่เติม Tween 20 เขย่าเป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นซึ่งนึ่งฆ่าเชื้อแล้วอีก 3 ครั้ง จากนั้นใช้ปากคีบคีบดอกตูม วางบนจานเพาะเชื้อที่มีพลาสติกที่นึ่งฆ่าเชื้อ แล้วใช้มีดและปากคีบดึงเอากลีบดอกออกให้เหลือแต่เส้าเกสร และใช้ปลายมีดแตะเบา ๆ เอาแต่อับเรณูออกมา

3.1.3.3.3 นำอับเรณู 3 ขนาด คือ 0.01 ×0.01, 0.05 ×0.05 และ 0.1 ×0.1 ซม มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง VW (CMU1)ในที่มืด เป็นเวลา 15 วัน คัดเลือกอับเรณูมาหนึ่งขนาด โดยเลือกขนาดที่เจริญเติบโตดีที่สุดในอาหารเพาะเลี้ยง

3.1.3.3.4 นำอับเรณูที่เตรียมได้จากข้อ 3.1.3.3.3 มาผ่านการทำ pretreatment โดยการเลี้ยงในสารละลายซูโครสที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ระดับ คือ ความเข้มข้น 3%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และ 6% นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 100 รอบ/นาที อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ในที่มืด

3.1.3.4 วิธีการทดลอง นำอับเรณูที่เตรียมได้จากข้อ 3.1.3.3.4 ย้ายลงสารละลายซูโครสความเข้มข้น 2 ระดับ คือ 3 % และ 6 % ที่เลี้ยงในที่มืด ครบ 3 วัน ใช้ปากคีบคีบอับเรณูในทุกความเข้มข้นของสารละลายซูโครส วางบนอาหารแข็งที่เตรียมในแต่ละกรรมวิธี ดังระบุในข้อ 3.1.3.1 จากนั้นนำไปเลี้ยงในที่มืด

3.1.4 การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกการเปลี่ยนแปลงของอับเรณูในช่วง 4 สัปดาห์หลังจากการเพาะ

3.2 ผลของสูตรอาหาร MS ร่วมกับ 2, 4-D ต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณู

3.2.1 วัสดุทดลอง คือ อับเรณูขนาด 0.05 ×0.05 ซม

3.2.2 วัสดุอุปกรณ์ และ วิธีการในการเพาะเลี้ยง

3.2.2.1 อุปกรณ์

3.2.2.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยง ใช้อุปกรณ์เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1 ข้อ 2.1.2.1.1

3.2.2.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในตู้กรองอากาศ ใช้อุปกรณ์เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1 ข้อ 2.1.2.1.2

3.2.2.2 สารเคมี

3.2.2.2.1 สารที่ใช้สำหรับทำความสะอาดและฟอกฆ่าเชื้อใช้เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1 ข้อ 2.1.2.1.3.1

3.2.2.2.2 สารที่ใช้สำหรับเตรียมอาหารใช้เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1 ข้อ 2.1.2.1.3.2 เพียงแต่เปลี่ยนจากการใช้สารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก สูตร VW(CMU1) เป็นธาตุอาหารหลักสูตร MS

3.2.2.2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช คือ NAA, BA และ 2, 4-D

3.2.3 วิธีการ

3.2.3.1 เตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต ดังแสดงไว้ในภาคผนวกที่ 12

3.2.3.2 วิธีการทดลองใช้วิธีการเดียวกับการทดลองในข้อ 3.1 เพียงแต่มีความแตกต่างตรงที่อาหารเพาะเลี้ยงในการทดลองนี้เป็นอาหารแข็งสูตร MSดัดแปลง วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ มีกรรมวิธีรวมทั้งหมด 6 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำเช่นกัน โดยมีกรรมวิธีการทดลอง ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 1 NAA 2 มล/ล + BA 1 มล/ล + 2,4-D 0 มล/ล

กรรมวิธีที่ 2 NAA 2 มล/ล + BA 1 มล/ล + 2,4-D 2 มล/ล

กรรมวิธีที่ 3 NAA 2 มล/ล + BA 1 มล/ล + 2,4-D 4 มล/ล

กรรมวิธีที่ 4 NAA 2 มล/ล + BA 1 มล/ล + 2,4-D 0 มล/ล

กรรมวิธีที่ 5 NAA 2 มล/ล + BA 1 มล/ล + 2,4-D 2 มล/ล

กรรมวิธีที่ 6 NAA 2 มล/ล + BA 1 มล/ล + 2,4-D 4 มล/ล

3.2.4 การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกการเปลี่ยนแปลงของอับเรณูในช่วง 4 สัปดาห์หลังจากการเพาะ

การทดลองที่ 4 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต

การทดลองนี้เป็นการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิดคือ NAA และBA ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนของกิ่งก้านของเอื้องน้ำต้น เมื่อเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ การทดลองนี้ แบ่งออกเป็น 3 ทดลองย่อย คือ **ผลของ BA และ NAA ต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนใบอ่อน**, **ผลของ NAA และ TDZ ต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนก้านช่อดอกอ่อน** และ **ผลของ 2, 4-D และTDZ ต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนปลายยอด** การทดลองทั้ง 3 มีอุปกรณ์ และ วิธีการทดลองดังนี้

4.1 ผลของ BA และ NAA ต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนใบอ่อน

4.1.1 วัสดุทดลอง คือ ชิ้นส่วนใบขนาด 1×1 ซม

4.1.2 อุปกรณ์และวิธีการในการเพาะเลี้ยง

4.1.2.1 อุปกรณ์

4.1.2.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงใช้เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1 ข้อ 2.1.2.1.1

4.1.2.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในตู้กรองอากาศ ใช้เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1 ข้อ 2.1.2.1.2

4.1.2.2 สารเคมี

4.1.2.2.1 สารที่ใช้สำหรับทำความสะอาดและฟอกฆ่าเชื้อใช้เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1 ข้อ 2.1.2.1.3.1

4.1.2.2.2 สารที่ใช้สำหรับเตรียมอาหาร ใช้เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1 ข้อ 2.1.2.1.3.2

4.1.2.2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช คือ NAA และ BA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.1.3 วิธีการ

4.1.3.1 การเตรียมอาหารวุ้นสำหรับเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อน เตรียมอาหารแข็งสูตร VW(CMU1) ตามวิธีการที่บรรยายไว้ในภาคผนวกที่ 6 ส่วนในการทดลองนี้มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตลงไปด้วย คือ เติม BA เข้มข้น 0, 0.5, 1.0 และ 2.0 มก/ล และ NAA เข้มข้น 0 และ 0.1 มก/ล วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ มีกรรมวิธีรวมทั้งหมด 8 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 BA 0 มล + NAA 0 มล
กรรมวิธีที่ 2 BA 0 มล + NAA 0.1 มล
กรรมวิธีที่ 3 BA 0.5 มล + NAA 0 มล
กรรมวิธีที่ 4 BA 0.5 มล + NAA 0.1 มล
กรรมวิธีที่ 5 BA 1 มล + NAA 0 มล
กรรมวิธีที่ 6 BA 1 มล + NAA 0.1 มล
กรรมวิธีที่ 7 BA 2 มล + NAA 0 มล
กรรมวิธีที่ 8 BA 2 มล + NAA 0.1 มล

4.1.3.2 เตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต ดังแสดงไว้ในภาคผนวกที่ 12

4.1.3.3 เตรียมเนื้อเยื่อใบ คือ นำเนื้อเยื่อใบอ่อนที่ได้จากใบคู่แรกของต้นอ่อนอายุ 4 เดือน ที่เจริญเติบโตจากเมล็ดที่เพาะเลี้ยงไว้ในอาหารวุ้นสูตร VW (CMU1) เลือกใบที่สมบูรณ์ และ มีสีเขียว ใช้มีดปลายแหลมตัดใบออกจากต้นอ่อนอย่างระมัดระวัง ใช้ปากคีบคีบชิ้นส่วนของใบอ่อน วางบนจานเพาะเชื้อที่มีพลาสติกที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใช้มีดปลายแหลมตัดเนื้อเยื่อใบให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 1×1 ซม

4.1.2.4 วิธีการทดลอง คือ นำชิ้นส่วนใบที่ได้จากการเตรียมในข้อ 4.1.2.3 ไปเลี้ยงบนอาหารที่เตรียมไว้ในข้อ 4.1.2.1 โดยใส่ชิ้นส่วนใบ 1 ชิ้นต่อหลอด ในแต่ละกรรมวิธี จากนั้นนำไปเลี้ยงบนชั้น โดยให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสงประมาณ 30 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที ตลอด 24 ชั่วโมง

4.1.4 การบันทึกผลการทดลอง

4.1.3.1 จำนวนชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัส
4.1.3.2 เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส
4.1.3.3 จำนวนต้นต่อชิ้นส่วน
4.1.3.4 ความสูงต้น
4.1.3.5 จำนวนราก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.1.3.6 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วน

4.2 ผลของ NAA และ TDZ ต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนก้านช่อดอกอ่อน

4.2.1 พืชทดลอง คือ ก้านช่อดอกอ่อน ยาว 1 ซม

4.2.2 อุปกรณ์และวิธีการในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทดลอง

4.2.2.1 อุปกรณ์

4.2.2.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยง ใช้เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1 ข้อ 2.1.2.1.1

4.2.2.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในตู้กรองอากาศ ใช้เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1 ข้อ 2.1.2.1.2

4.2.2.3 สารเคมี

4.2.2.3.1 สารที่ใช้สำหรับทำความสะอาดและฟอกฆ่าเชื้อใช้เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1 ข้อ 2.1.2.1.3.1

4.2.2.3.2 สารที่ใช้สำหรับเตรียมอาหาร ใช้เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1 ข้อ 2.1.2.1.3.2

4.2.2.3.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช คือ TDZ และ NAA

4.2.3 วิธีการ

4.2.3.1 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงชิ้นส่วนก้านช่อดอกอ่อน เตรียมอาหารแข็งสูตร VW (CMU1) ตามวิธีการที่บรรยายไว้ในภาคผนวกที่ 8 ส่วนในการทดลองนี้มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตลงไปด้วย คือ เติม TDZ เข้มข้น 0, 0.5, 1.0 และ 2.0 มก/ล และ NAA 0 และ 0.1 มก/ล วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ มีกรรมวิธีรวมทั้งหมด 8 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 TDZ 0 มล + NAA 0 มล
กรรมวิธีที่ 2 TDZ 0 มล + NAA 0.1 มล
กรรมวิธีที่ 3 TDZ 0.5 มล + NAA 0 มล
กรรมวิธีที่ 4 TDZ 0.5 มล + NAA 0.1 มล
กรรมวิธีที่ 5 TDZ 1 มล + NAA 0 มล
กรรมวิธีที่ 6 TDZ 1 มล + NAA 1 มล
กรรมวิธีที่ 7 TDZ 2 มล + NAA 0 มล
กรรมวิธีที่ 8 TDZ 2 มล + NAA 0.1 มล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2.3.2 เตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต ดังแสดงไว้ในภาคผนวกที่ 12

4.2.2.3 วิธีการเตรียมก้านช่อดอก คือ เนื้อเยื่อของก้านช่อดอกที่ใช้เป็นก้านในระยะที่ดอกยังไม่บาน ตัดก้านช่อดอกมาทำความสะอาดเบื้องต้น โดยล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อนาน 10 นาที จากนั้นตัดส่วนของดอกย่อยภายในช่อออกให้เหลือเฉพาะก้านช่อดอก นำมาทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจาน แล้วใช้ฟองน้ำถูบริเวณก้านช่อดอกเบาๆ จากนั้นล้างน้ำให้สะอาด แล้วนำเข้าตู้ปลอดเชื้อ เช็ดด้วย ethyl alcohol 70% ก่อนนำมาฟอกในสารละลายคลอร๊อกซ์ 20 % นาน 15 นาที หลังจากนั้นล้าง 3 ครั้งด้วยน้ำกลั่นซึ่งนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ฟอกด้วยสารละลาย Strepto 1 กรัม/100 มล เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง นำก้านช่อดอกที่ผ่านการเตรียมดังกล่าวไปวางบนจานเพาะเชื้อที่มีพลาสติกรองตัดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใช้มีดปลายแหลมตัดเอาบริเวณข้อของก้านช่อดอก โดยตัดส่วนปลายก้านช่อดอกทั้ง 2 ข้างให้ปลายทั้ง 2 ข้างห่างจากตาประมาณ ½ ซม แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นโดยวางชิ้นส่วนให้ตำแหน่งตาสัมผัสกับอาหารพอดี

4.2.2.4 วิธีการทดลอง คือ นำชิ้นส่วนก้านช่อดอกอ่อนที่ได้จากการเตรียมในข้อ 4.2.2.3 ไปเลี้ยงบนอาหารสูตร VW (CMU1) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด ดังระบุในข้อ 4.2.3.1 เลี้ยงในหลอดอาหารโดยใส่หลอดละ 1 ข้อ ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสงประมาณ 30 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที ตลอด 24 ชั่วโมง

4.2.4 การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกผลการทดลองเช่นเดียวกับ การทดลองที่ 4.1

4.3 ผลของ 2, 4-D และTDZ ต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนปลายยอด

4.3.1 วัสดุทดลอง คือ ปลายยอดขนาด 0.2 ซม

4.3.2 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการในการเพาะเลี้ยง

4.3.2.1 อุปกรณ์

4.3.2.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ใช้เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1 ข้อ 2.1.2.1.1

4.3.1.2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในตู้กรองอากาศ ใช้เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1 ข้อ 2.1.2.1.2

4.3.2.2 สารเคมี

4.3.2.2.1 สารที่ใช้สำหรับทำความสะอาดและฟอกฆ่าเชื้อใช้เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1 ข้อ 2.1.2.1.3.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3.2.2.2 สารที่ใช้สำหรับเตรียมอาหารใช้เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1 ข้อ 2.1.2.1.3.2

4.3.2.2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช คือ TDZ และ NAA

4.3.3 วิธีการ

4.3.3.1 เตรียมอาหารวุ้นสำหรับเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอด โดยการเตรียมอาหารแข็งสูตร VW (CMU1) ตามวิธีการที่บรรยายไว้ในภาคผนวกที่ 10 ในการทดลองนี้มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตลงไปในอาหารด้วย คือ เติม 2, 4-D เข้มข้น 0, 0.5, 1.0 และ 2.0 มก/ล และ TDZ เข้มข้น 0, 1.0 และ 2.0 มก/ล วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ มีกรรมวิธีรวมทั้งหมด 12 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 2, 4-D 0 มล/ล + TDZ 0 มล/ล
กรรมวิธีที่ 2 2, 4-D 0.1 มล/ล + TDZ 0 มล/ล
กรรมวิธีที่ 3 2, 4-D 1 มล/ล + TDZ 0 มล/ล
กรรมวิธีที่ 4 2, 4-D 2 มล/ล + TDZ 0 มล/ล
กรรมวิธีที่ 5 2, 4-D 0 มล/ล + TDZ 1 มล/ล
กรรมวิธีที่ 6 2, 4-D 0.1 มล/ล + TDZ 1 มล/ล
กรรมวิธีที่ 7 2, 4-D 1 มล/ล + TDZ 1 มล/ล
กรรมวิธีที่ 8 2, 4-D 2 มล/ล + TDZ 1 มล/ล
กรรมวิธีที่ 9 2, 4-D 0 มล/ล + TDZ 2 มล/ล
กรรมวิธีที่ 10 2, 4-D 0.1 มล/ล + TDZ 2 มล/ล
กรรมวิธีที่ 11 2, 4-D 1 มล/ล + TDZ 2 มล/ล
กรรมวิธีที่ 12 2, 4-D 2 มล/ล + TDZ 2 มล/ล

4.3.3.2 เตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต ดังแสดงในภาคผนวกที่ 12

4.3.3.3 เตรียมพืชทดลอง คือ ปลายยอดของเอื้องน้ำต้นที่เกิดจากการนำฝักอายุ 10 สัปดาห์ ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้ปลอดเชื้อ โดยปฏิบัติเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1 ข้อที่ 2.1.2.2 มาเพาะในอาหารเหลวสูตร VW (CMU1) เป็นเวลา 15 วัน เมื่อเมล็ดเริ่มงอกเป็นโปรโตคอร์มเล็ก ๆ ใช้หลอดดูดดูดเมล็ดจากอาหารเหลวดังกล่าว พ่นลงไปในอาหารวุ้นสูตร VW (CMU1) เลี้ยงจนกว่าโปรโตคอร์มเจริญเป็นยอดขนาด 0.2 ซม

4.3.3.4 วิธีการเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอด คือ นำปลายยอดที่ระบุไว้ในข้อ 4.3.3.3 ไปเลี้ยงบนอาหารสูตร VW (CMU1) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด คือ 2, 4-D และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

TDZ ที่ระบุในข้อ 4.3.3.1 เลี้ยงในหลอดหลอดละ 1 ชิ้น ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสงประมาณ 30 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที ตลอด 24 ชั่วโมง

4.3.4 การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกผลการทดลองเช่นเดียวกับ การทดลองที่ 4.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved