บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 ช่อดอกอ่อนของกระเจียวพลอยทักษิณ เบอร์ A033 ขนาดความยาว 1.0, 1.5 และ 2.0 ซม.

1.2 หน่อของกระเจียวพลอยทักษิณ เบอร์ A033 ขนาดความสูง 10 15 และ 20 ซม

1.3 ต้นพืชทดลองที่ได้จากการขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ

1.4 ตู้กรองอากาศบริสุทธิ์ (air flow carbinet)

1.5 ชั้นสำหรับวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.6 เครื่องเขย่า

1.7 เครื่องชั่งชนิดละเอียด (analytical balance)

1.8 เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดทศนิยม 3 และ 4 ตำแหน่ง (electrical balance)

1.9 เครื่องฝานเนื้อเยื่อ (rotary microtome)

1.10 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH metre)

1.11 กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X

1.12 หม้อนึ่งความดันไอ

1.13 เตาไฟฟ้า

1.14 หลอดทดลองขนาด 2.5 x 15.0 x ซม

1.15 ช้อนตักสาร

1.16 จานเลี้ยงเชื้อ

1.17 เครื่องแก้วอื่นๆ เช่น ปิเปต บีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล. กระบอกวัดปริมาตร แท่งแก้ว ขวดใส่สารละลายเข้มข้น เป็นต้น

1.18 วัสดุที่ใช้ในตู้กรองอากาศได้แก่

   1.18.1 ด้ามมีดผ่าตัดเบอร์ 3

   1.18.2 ใบมีดผ่าตัดเบอร์ 11

   1.18.3 ใบมีดโกนที่ตัดเป็นใบมีดเล็กขนาด 0.2 x 1.0 ซม

   1.18.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.18.5 ปากคีบทนไฟขนาดความยาว 14 และ 18 ซม

1.18.6 แผ่นพลาสติกตัดเป็นแผ่นสี่เหลี่ยมขนาด 7 x 9 ซม

1.18.7 หลอดทดลองใส่แอลกอฮอล์

1.18.8 บีกเกอร์ขนาด 50 มล สำหรับวางหลอดทดลองที่ใส่แอลกอฮอล์

1.19 วัสดุอื่นๆ เช่นแผ่นอลูมิเนียม(aluminium foil) ยางรัดของ แผ่นป้ายกรรมวิธี

1.20 น้ำกลั่น ซึ่งกลั่นจากเครื่องแก้ว

2 สารเคมี

2.1 สารที่ใช้ทำความสะอาดฆ่าเชื้อ

2.1.1 ethanol ความเข้มข้น 70%

2.1.2 clorox ของบริษัท The Clorox Co. Oakland, USA.

2.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมอาหาร

2.2.1 เกลือให้ธาตุอาหารหลักต่างๆ ตามสูตร MS (1962)

2.2.2 เกลือให้ธาตุอาหารรองต่างๆ ตามสูตร MS (1962)

2.2.3 วิตามินต่างๆ ตามสูตร MS (1962)

2.2.4 Glycine

2.2.5 Myo-inositol

2.2.6 Ferrous sulfate ของบริษัท J.T Baker Chemical CO., Philipsburg N.J.,USA

2.2.7 Ethylene diamine tetraacetic acid diNasalt dihydrate ของบริษัท Koch Light Laboratories Ltd., England

2.2.8 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

2.2.8.1 6-furfuryl aminopurine (Kinetin) ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA

2.2.8.2 Benzyl amino purine (BAP) ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA

2.2.9 Potassium hydroxide 1N

2.2.10 Hydrochloric acid 1N

2.2.11 น้ำมะพร้าว

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

2.2.12 น้ำตาลซูโครส (น้ำตาลทราย)

2.2.13 ผงวุ้นตราเฮลิคอปเตอร์

2.3 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

2.3.1 Ethanol เข้มข้น 70 และ 95%

2.3.2 Butanol

2.3.3 Glacial acetic acid

2.3.4 Xylol

2.3.5 Ether

2.3.6 Paraffin oil

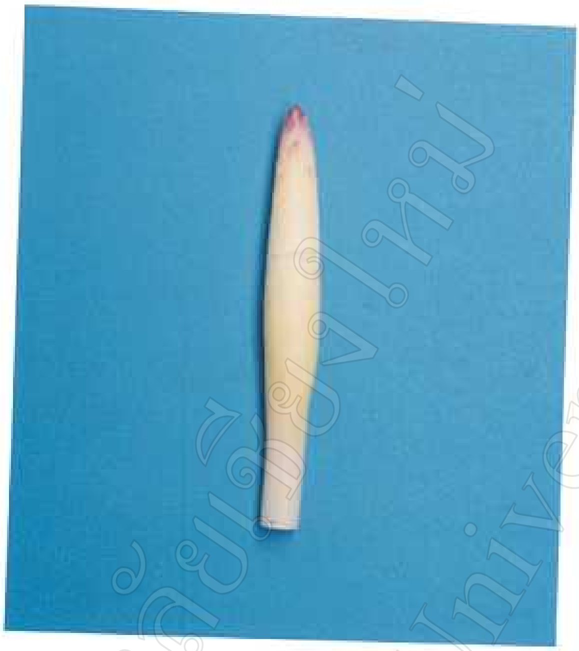
2.3.7 Paraffin

2.3.8 สีย้อม Erythrosin และ Haematocylin

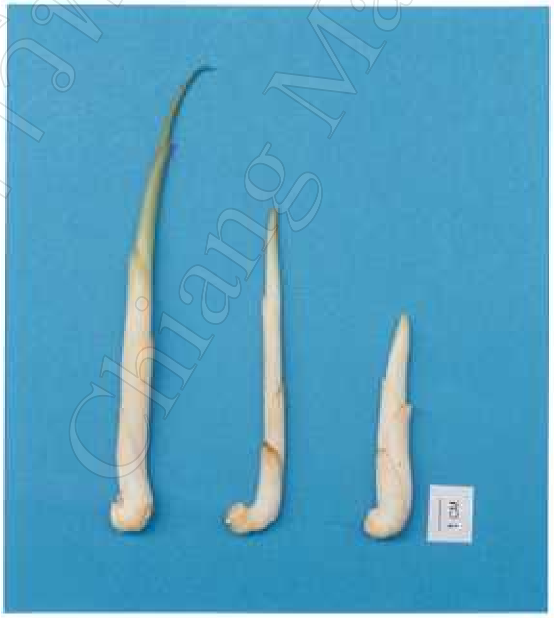
2.3.9 น้ำยา Canada balsam

3. การเตรียมต้นพืชทดลอง

ต้นพืชทดลองที่ใช้ในการศึกษานี้ได้มาจากกระเจียวพลอยทักษิณ (Curcuma aurantiaca van Zijp.) เบอร์ A033 โดยใช้ต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากแปลงปลูกของ ศูนย์บริการการพัฒนาและขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่อันเนื่องมาจากพระราชดำริ โดยใช้ช่อดอกอ่อนขนาด 1.0 ,1.5 และ 2.0 ซม ที่ยังไม่โผล่พ้นลำต้นเทียม (ภาพที่ 3) และจากหน่อข้างขนาดความสูง 10 15 และ 20 ซม ที่แตกออกมาจากเหง้าเดิม (ภาพที่ 4) โดยนำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำไหลเพื่อให้ดินที่ติดมาออกให้หมด แล้วล้างด้วยน้ำยาล้างจาน หลังจากนั้นลอกกาบใบออก 1 - 2 ชั้น ล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง ซับน้ำให้แห้งแล้วทำการฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% โดยเช็ดให้ทั่วผิวภายนอก จากนั้นทำการฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 โดยนำไปเขย่าในสารละลายคลอร๊อกซ์ที่มีความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นจึงนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ในตู้ปลอดเชื้อ ช่อดอกอ่อนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วพร้อมที่จะนำไปทดลองในการทดลองที่ 1 ส่วนหน่อข้างจะนำไปทดลองในการทดลองที่ 2 และ 3 ต่อไป โดยเพาะเลี้ยงบนชั้นที่มีความเข้มแสงประมาณ 1,700 ลักซ์ โดยได้รับแสง 16 ชม/วัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °ซ



ภาพที่ 3 ช่อดอกอ่อนของกระเจียวพลอยทักษิณ เบอร์ A 033



ภาพที่ 4 หน่อข้างของกระเจียวพลอยทักษิณ เบอร์ A 033

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

4. การเตรียมสารละลายเข้มข้น (Stock solution)

4.1 การเตรียมธาตุอาหารหลัก

เตรียมธาตุอาหารหลักแต่ละชนิดในสูตร MS(1962) แยกกัน โดยให้แต่ละชนิดมีความเข้มข้น 1 โมลาร์(M) ปริมาตรชนิดละ 200 มล โดยใช้ปริมาณสารดังต่อไปนี้ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ชนิดและปริมาณของสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร MS(1962)

ชนิดของสาร	ปริมาณสารในสูตร MS(1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาเข้มข้น 200 มล (ก)
NH_4NO_3	1,650	16.008
KNO_3	1,900	20.220
$CaCl_2 . 2H_2O$	440	22.198
$MgSO_4 . 7H_2O$	370	49.296
KH_2PO_4	170	27.218

4.2 การเตรียมธาตุอาหารรอง

เตรียมธาตุอาหารรองสูตร MS (1962) ดัดแปลง โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน ความเข้มข้นของสารมากกว่าที่ใช้จริง 100 เท่า เตรียมให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล โดยใช้น้ำหนักของสารดังต่อไปนี้ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ชนิดและปริมาณของสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรองสูตร MS (1962) ดัดแปลง

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาเข้มข้น ปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล (มก)
$CuSO_4 . 5H_2O$	0.025	2.5
KI	0.830	83.0
$ZnSO_4 . 7H_2O$	8.600	860.0
$MnSO_4 . 4H_2O$	22.300	2,230.0
H_3BO_3	6.200	620.0
$Na_2MoO_4 . 2H_2O$	0.250	25.0
$CoCl_2 . 6H_2O$	0.025	0.5

4.3 การเตรียมวิตามิน

เตรียมวิตามินในสูตร MS (1962) ดัดแปลง ที่เติม glycine และ myo-inositol โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน ความเข้มข้นของสารมากกว่าที่ใช้จริง 100 เท่า เตรียมให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล โดยใช้น้ำหนักของสารดังต่อไปนี้ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ชนิดและปริมาณของสารในสารละลายเข้มข้นของวิตามินสูตร MS (1962) ดัดแปลง

ชนิดของสาร	ปริมาณสารในสูตร MS(1962) (มก/ล)	ปริมารสารในน้ำยาเข้มข้น ปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล (มก)
glycine[1/]	2.00	200
myo-inositol[1/]	100.00	10,000
thiamine.HCl	0.25	25
pyridoxine.HCl	0.25	25
nicotinic acid	0.25	25

หมายเหตุ

[1/] = อินทรีย์สารที่ไม่ใช่วิตามิน

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

4.4 การเตรียมสารละลายเหล็กในรูป FeEDTA

เตรียม FeEDTA ในสูตร MS (1962) ซึ่งประกอบด้วย $FeSO_4.H_2O$ และ $Na_2EDTA.2H_2O$ โดยทำเป็นสารละลายความเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน ความเข้มข้นของสารมากกว่าที่ใช้จริง 100 เท่า ทำการเตรียมโดยชั่งสารแต่ละชนิดแล้วแยกละลายในน้ำให้มีปริมาตรสุดท้ายของแต่ละส่วน 500 มล หลังจากนั้นจึงนำมาผสมไว้ในขวดเดียวกันภายในขวดที่ทึบแสงหรือขวดที่หุ้มด้วยแผ่นอลูมิเนียมให้มิดชิดเพื่อป้องกันแสงโดยใช้น้ำหนักของสารแต่ละชนิดดังต่อไปนี้ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ชนิดและปริมาณของสารในสารละลายเข้มข้นของเหล็กสูตร MS (1962) คัดแปลง

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาเข้มข้น ปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล (ก)
$FeSO_4 . 7H_2O$	27.8	2.78
$Na_2EDTA . 2H_2O$	37.3	3.73

4.5 การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต

4.5.1 การเตรียม kinetin

ชั่ง kinetin 10 มก ละลายด้วยสารละลาย 1N KOH จำนวนเล็กน้อยเพียงพอให้ละลายได้แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริงดูจากรายละเอียดจากแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในการทดลอง

4.5.2 การเตรียม BAP

ชั่ง BAP 10 มก ละลายด้วย 1 N KOH เช่นเดียวกับการเตรียม kinetin แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริงดูจากรายละเอียดจากแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในการทดลอง

5. การเตรียมอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962)

นำส่วนประกอบของอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962) จากน้ำยาเข้มข้นที่เตรียมในข้อ 4 มาผสมให้เข้ากันโดยใช้สารละลายเข้มข้นแต่ละชนิดดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 5

ขั้นตอนการเตรียมอาหารสูตร MS (1962) มีดังนี้

ใส่น้ำกลั่นลงไปในขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 1,000 มล ประมาณ 1/3 ของขวดแล้วเติมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักแต่ละชนิดลงไป โดยเขย่าให้สารละลายผสมกันดีระหว่างแต่ครั้งที่เติม แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปอีกเพื่อป้องกันการตกตะกอนก่อนที่จะเติมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรอง วิตามิน เหล็ก สารควบคุมการเจริญเติบโต และซูโครสซึ่งละลายแล้วในน้ำกลั่นลงไปตามลำดับ จากนั้นจึงเติมน้ำกลั่นลงไปอีกจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล เทสารละลายลงในบีกเกอร์ขนาด 2,000 มล นำไปปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 5.7 ± 0.1 โดยใช้ 1N HCl หรือ 1N KOH เมื่อปรับแล้วใส่ผงวุ้นลงไปในสารละลายแล้วจึงนำไปต้มให้วุ้นละลายจนหมด แบ่งอาหารที่เตรียมเทใส่หลอดทดลองขนาด 2.5 x 15 ซม หลอดละ 10 มล ปิดหุ้มปากหลอดทดลองด้วยพลาสติกทนร้อนขนาด 7 x 9 ซม รัดด้วยยางรัดของแล้วรัดหลอดรวมกัน 5 หลอด ปิดหุ้มทับด้วยกระดาษลอกลายขนาด 12 x 18 ซม แล้วรัดด้วยยางรัดอีกครั้ง สำหรับการเตรียมอาหารเหลวเทใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มล โดยมีปริมาตรตามที่กำหนดในแต่ละกรรมวิธีในการทดลองแล้วปิดปากขวดลักษณะเช่นเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบของสารละลายเข้มข้นแต่ละชนิดในอาหารสูตร MS (1962) ดัดแปลง

ชนิดของสารละลาย	ปริมาณสารละลายเข้มข้นในอาหาร 1 ลิตร (มล)
ธาตุอาหารหลัก	
ความเข้มข้นชนิดละ 1M	
NH_4NO_3	20.6
KNO_3	18.8
$CaCl_2 . 2H_2O$	4.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.5
KH_2PO_4	1.3
ธาตุอาหารรอง เหล็ก และวิตามิน	
ความเข้มข้นชนิดละ 100X	
ธาตุอาหารรอง	10.0
เหล็ก (FeEDTA)	10.0
วิตามิน	10.0
สารควบคุมการเจริญเติบโต	
kinetin	*
BAP	*
น้ำตาลซูโครส (น้ำตาลทราย) (น้ำหนัก/ปริมาตร)	30 ก/ล
ผงวุ้น (น้ำหนัก/ปริมาตร)	8 ก/ล

หมายเหตุ

* = ปริมาณที่ใช้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่กำหนดในแต่ละกรรมวิธีในการทดลอง

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

6. วิธีการวิจัย

6.1 **การทดลองที่ 1** ผลของขนาดและตำแหน่งของชิ้นส่วนจากช่อดอกอ่อนเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มี kinetin ระดับต่างๆ ต่อการพัฒนาของชิ้นส่วนที่เลี้ยง

6.1.1 **พืชทดลอง**

นำช่อดอกอ่อนที่ยังไม่โผล่พ้นกาบใบที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งได้อธิบายในข้อ 3 มาตัดโดยเริ่มจากการลอกกาบใบออกทีละชั้นจนถึงส่วนของช่อดอกอ่อนแล้วแบ่งเป็น 3 ส่วนเท่าๆกัน คือ ส่วนยอด ส่วนกลาง และส่วนโคนเป็นชิ้นส่วนของพืชทดลอง

6.1.2 **อาหาร**

ใช้อาหารวุ้นสูตร MS (1962) ที่เติม kinetin ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ โดยเตรียมใส่หลอดทดลองขนาด 2.5 x 15 ซม ปริมาตรหลอดละ 10 มล

6.1.3 **วิธีการทดลอง**

ทำการทดลอง 3 ปัจจัยคือ ความเข้มข้นของ kinetin ขนาดของช่อดอก และตำแหน่งของช่อดอก

6.1.3.1 ความเข้มข้นของ kinetin ที่ระดับต่างๆ ดังนี้ 0, 0.25, 0.5 และ 1.0 มก/ล

6.1.3.2 ขนาดความยาวของช่อดอก ดังนี้ 1.0, 1.5 และ 2.0 ซม

6.1.3.3 ตำแหน่งของชิ้นส่วนบนช่อดอก ดังนี้ ส่วนยอด, ส่วนกลาง และส่วนโคน

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) รวมทั้งสิ้น 36 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ (ตารางที่ 6)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางที่ 6 กรรมวิธีในการทดลองที่ 1

ขนาดช่อดอก (ซม)	ตำแหน่งช่อดอก	ความเข้มข้นของ kinetin (มก/ล)			
		0	0.25	0.5	1.0
1.0	ยอด	1	2	3	4
	กลาง	5	6	7	8
	โคน	9	10	11	12
1.5	ยอด	13	14	15	16
	กลาง	17	18	19	20
	โคน	21	22	23	24
2.0	ยอด	25	26	27	28
	กลาง	29	30	31	32
	โคน	33	34	35	36

6.1.4 **การบันทึกผล**

6.1.4.1 **บันทึกลักษณะการเจริญของต้น ดังนี้**

6.1.4.1.1 วันที่เกิดยอด

6.1.4.1.2 วัดความสูงของต้นในแต่ละสัปดาห์เป็นเวลา 4 สัปดาห์ หลังการเพาะเลี้ยง

6.1.4.1.3 นับจำนวนใบเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

6.1.4.1.4 จำนวนต้นทั้งหมดเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

6.1.4.1.5 ลักษณะอื่นๆ เช่นสีของใบที่ผิดปกติ การเกิดแคลลัส ฯลฯ

6.1.4.2 **บันทึกลักษณะการเจริญเติบโตของราก ดังนี้**

6.1.4.2.1 วันที่เริ่มเกิดราก

6.1.4.2.2 จำนวนรากต่อกอเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

6.1.4.2.3 วัดความยาวของรากที่ยาวที่สุดเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

6.1.4.2.4 ลักษณะอื่นๆ เช่น ความผิดปกติของราก สีของราก ฯลฯ

โดยค่าเฉลี่ยที่แสดงผลในทุกๆ ลักษณะของทุกการทดลองมีค่าเท่ากับ $\overline{X} \pm SD$

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

6.2 **การทดลองที่ 2** ผลของขนาดหน่อเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มี BAP ระดับต่างๆ ต่อการพัฒนาของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง

6.2.1 **พืชทดลอง**

นำหน่อพืชที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งได้อธิบายในข้อ 3 มาตัดโดยเริ่มจากการลอกกาบใบออก 1 ชั้น ใช้ตาตำแหน่งที่ 1 จากโคนหน่อ ย้ายลงอาหารทดลองหลอดละ 1 ตา

6.2.2 **อาหาร**

ใช้อาหารวุ้นสูตร MS (1962) ที่เติม BAP ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ โดยเตรียมใส่หลอดทดลองขนาด 2.5 x 15 ซม ปริมาตรหลอดละ 10 มล

6.2.3 **วิธีการทดลอง**

ทำการทดลอง 2 ปัจจัยคือ ความเข้มข้นของ BAP และขนาดความสูงของหน่อ

6.2.3.1 ความเข้มข้นของ BAP ที่ระดับต่างๆ ดังนี้ 0, 1.5, 3.0, 4.5 และ 6.0 มก/ล

6.2.3.2 ขนาดความสูงของหน่อ ดังนี้ 10, 15 และ 20 ซม

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ รวมทั้งสิ้น 15 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 กรรมวิธีในการทดลองที่ 2

BAP (มก/ล) ขนาดหน่อ (ซม)	0	1.5	3.0	4.5	6.0
10	1	2	3	4	5
15	6	7	8	9	10
20	11	12	13	14	15

6.2.4 **การบันทึกผล**

ทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

6.3 **การทดลองที่ 3** การเปรียบเทียบตำแหน่งของตาที่อยู่บนหน่อและขนาดของหน่อต่อการพัฒนาของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง

6.3.1 **พืชทดลอง**

นำหน่อข้างที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งได้อธิบายในข้อที่ 3 มาตัดโดยเริ่มจากการลอกกาบใบออก 1 ชั้น ใช้ตำแหน่งตาตำแหน่งที่ 1, 2 และ 3 จากโคน ย้ายลงอาหารหลอดละ 1 ตา

6.3.2 **อาหาร**

ใช้อาหารวุ้นสูตร MS (1962) ที่เติม BAP ความเข้มข้น 3.0 มก/ล โดยเตรียมใส่หลอดทดลองขนาด 2.5 x 15 ซม ปริมาตรหลอดละ 10 มล

6.3.3 **วิธีการทดลอง**

ทำการทดลอง 2 ปัจจัยคือ ขนาดความสูงของหน่อและตำแหน่งของตา

6.3.3.1 ขนาดความสูงของหน่อ คือ 10 และ 20 ซม

6.3.3.2 ตำแหน่งของตาจากโคนหน่อ คือ ตำแหน่งที่ 1, 2 และ 3

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ รวมทั้งสิ้น 6 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 กรรมวิธีในการทดลองที่ 3

ตำแหน่งของตา ขนาดของหน่อ (ซม)	1	2	3
10	1	2	3
20	4	5	6

6.3.4 **การบันทึกผล**

ทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

6.4 การทดลองที่ 4 ผลของจำนวนชิ้นส่วนโคนกาบใบ ปริมาตรของอาหารเหลวและสภาพการเพาะเลี้ยงที่มีต่อการเจริญของกระเจียว

6.4.1 พืชทดลอง

ใช้ยอด (shootlet) ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อของการทดลองที่ 1 2 และ3 บนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม BAP ความเข้มข้น 3.0 มก/ล โดยเลือกต้นที่มีความสม่ำเสมอกันและมีใบ 3 ใบ ตัดออกให้เหลือความยาววัดจากโคนต้นขึ้นมา 1.0 ซม ตัดรากทิ้งไปจากนั้นแบ่งครึ่งตามยาว

6.4.2 อาหาร

ใช้อาหารเหลวสูตร MS (1962) ที่เติม BAP ความเข้มข้น 3.0 มก/ล โดยเตรียมใส่ขวดรูปชมพู่ ปริมาตรตามที่กำหนดในแต่ละวิธี

6.4.3 วิธีการทดลอง

ทำการทดลอง 3 ปัจจัยคือ สภาพการเพาะเลี้ยง จำนวนชิ้นส่วนโคนกาบใบ และปริมาตรของอาหาร

6.4.3.1 สภาพการเพาะเลี้ยง ดังนี้ วางบนชั้นปกติ และวางบนเครื่องเขย่า

6.4.3.2 จำนวนชิ้นส่วนโคนกาบใบ ดังนี้ 10 และ 15 ชิ้นต่อขวดทดลอง

6.4.3.3 ปริมาตรอาหารดังนี้ 15 และ 20 มล

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ รวมทั้งสิ้น 8 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 กรรมวิธีในการทดลองที่ 4

สภาพการเพาะเลี้ยง	จำนวนชิ้นส่วน(ชิ้น) ปริมาตรอาหาร (มล)	10	15
วางชั้นปกติ	15	1	2
	20	3	4
วางบนเครื่องเขย่า	15	5	6
	20	7	8

6.4.4 **การบันทึกผล**

ทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

6.5 **การทดลองที่ 5** ผลของความสูงของชิ้นส่วนและวิธีตัดแบ่งต่อการแตกหน่อ และการเจริญของชิ้นส่วนโคนกาบใบ

6.5.1 **พืชทดลอง**

ใช้ยอด (shootlet) ซึ่งได้จากการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS(1962) ที่เติม BAP ความเข้มข้น 3 มก/ล โดยเลือกต้นที่มีความสม่ำเสมอกันตัดใบออกให้เหลือความสูงและวิธีการตามที่กำหนด ตัดรากทิ้งไปย้ายลงอาหารทดลองขวดละ 5 ชิ้นส่วน

6.5.2 **อาหาร**

ใช้อาหารวุ้นสูตร MS(1962) ที่เติม BAP 3 มก/ล โดยเตรียมใส่ flask ขนาด 125 มล ขวดละ 20 มล

6.5.3 **วิธีการทดลอง**

ทำการทดลอง 2 ปัจจัยคือ ความสูงของชิ้นส่วนและวิธีการผ่าแบ่ง

6.5.3.1 ความสูงของชิ้นส่วนมี 4 ระดับ คือ 0.3, 0.5, 1.0 และ 1.5 ซม

6.5.3.2 วิธีการตัดแบ่งมี 2 วิธี คือ แบ่งเป็น 1/2 ส่วนตามยาวและชิ้นส่วนปกติ

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ รวมทั้งสิ้น 8 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ (ตารางที่ 10)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางที่ 10 กรรมวิธีในการทดลองที่ 5

ความสูงชิ้นส่วน (ซม) วิธีการตัดแบ่ง	0.3	0.5	1.0	1.5
ไม่ผ่าแบ่ง	1	2	3	4
แบ่งเป็น 1/2 ส่วนตามยาว	5	6	7	8

6.5.4 **การบันทึกผล**

ทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

6.6 **การทดลองที่ 6** การเปรียบเทียบชนิดอาหารและสภาพการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญของชิ้นส่วนโคนกาบใบ

6.6.1 **พืชทดลอง**

ใช้พืชทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 4 โดยอาหารวุ้นใช้ 5 ชิ้นส่วนต่อขวดทดลองและอาหารเหลวใช้ 10 ชิ้นส่วนต่อขวดทดลอง

6.6.2 **อาหาร**

ใช้อาหารวุ้นและอาหารเหลวสูตร MS(1962) ที่เติม BAP ความเข้มข้น 3.0 มก/ล โดยเตรียมใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล ขวดละ 20 มล และอาหารเหลวสูตร MS(1962) บรรจุลงในถุง neoflon film 50 µM ใส่อาหารช่องละ 20 มล

6.6.3 **วิธีการทดลอง**

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ รวมทั้งสิ้น 7 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ โดยชิ้นส่วนที่ใช้เลี้ยงมีขนาดความสูง 1.0 ซม และแบ่งครึ่งตามยาว ยกเว้นกรรมวิธีที่ 6 ใช้ชิ้นส่วนขนาดความสูง 0.5 ซม และแบ่งครึ่งตามยาว ในสภาพต่าง ๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 อาหารวุ้น วางบนชั้นปกติ

กรรมวิธีที่ 2 อาหารเหลว วางบนชั้นปกติ

กรรมวิธีที่ 3 อาหารเหลว วางบนเครื่องเขย่า

กรรมวิธีที่ 4 อาหารวุ้น เลี้ยงในสภาพ CO_2 3,000 สตล

กรรมวิธีที่ 5 อาหารเหลว เลี้ยงในสภาพ CO_2 3,000 สตล

กรรมวิธีที่ 6 อาหารเหลว บรรจุในถุง neoflon film 50 μM เลี้ยงในสภาพCO_2 3,000 สตล (ชิ้นส่วนสูง 0.5 ซม)

กรรมวิธีที่ 7 อาหารเหลว บรรจุในถุง neoflon film 50 μM เลี้ยงในสภาพ CO_2 3,000 สตล

6.6.4 การบันทึกผล

6.6.4.1 ทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

6.6.4.2 บันทึกลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา

6.6.4.2.1 นำตัวอย่างใบจากต้นที่เลี้ยงบนอาหารวุ้น และในอาหารเหลว ไปทำการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาเพื่อดูภาพตัดขวางของใบที่ปกติและผิดปกติ

6.6.4.2.2 นำตัวอย่างชิ้นส่วนพืชความยาว 10 ซม แล้วแบ่ง 1/2 ส่วนตามยาว ที่เลี้ยงบนอาหารวุ้นไปทำการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาเพื่อดูจุดกำเนิดของยอดและจุดกำเนิดของราก

6.7 การทดลองที่ 7 ผลของระดับ BAP และน้ำมะพร้าวที่มีต่อการเจริญของชิ้นส่วนโคนกาบใบที่เลี้ยงบนอาหารวุ้น

6.7.1 พืชทดลอง

ใช้พืชทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 4 โดยใช้จำนวน 5 ชิ้นส่วนต่อหลอดทดลอง

6.7.2 อาหาร

ใช้อาหารวุ้นสูตร MS (1962) ที่เติม BAP และน้ำมะพร้าวที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันโดยเตรียมใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล ปริมาตรขวดละ 20 มล

6.7.3 วิธีการทดลอง

ทำการทดลอง 2 ปัจจัยคือ ความเข้มข้นของ BAP และน้ำมะพร้าว

6.7.3.1 ความเข้มข้นของ BAP ใช้ 4 ระดับคือ 0, 1.0, 2.0 และ 3.0 มก/ล

6.7.3.2 ความเข้มข้นของน้ำมะพร้าวใช้ 3 ระดับคือ 0, 10 และ 20% (ปริมาตร/ปริมาตร)

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ รวมทั้งสิ้น 12 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 กรรมวิธีในการทดลองที่ 7

น้ำมะพร้าว (%) BAP (มก/ล)	0	10	20
0	1	2	3
1.0	4	5	6
2.0	7	8	9
3.0	10	11	12

6.7.4 **การบันทึกผล**

ทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

6.8 **การทดลองที่ 8** ผลของระดับไนโตรเจนและ BAP ในอาหารที่มีต่อการเจริญของชิ้นส่วนโคนกาบใบที่เลี้ยงบนอาหารวุ้น

6.8.1 **พืชทดลอง**

ใช้พืชทดลองและจำนวนซ้ำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 4

6.8.2 **อาหาร**

ใช้อาหารวุ้นสูตร MS(1962) ที่เติม BAP และ NH_4NO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆกันโดยเตรียมใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล ขวดละ 20 มล

6.8.3 **วิธีการทดลอง**

ทำการทดลอง 2 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของ BAP และ NH_4NO_3

6.8.3.1 ความเข้มข้นของ BAP ใช้ 4 ระดับคือ 0, 1.0, 2.0 และ 3.0 มก/ล

6.8.3.2 ความเข้มข้นของ NH$_4$NO$_3$ ใช้ 4 ระดับคือ 0, 1X, 1.5X และ 2.0X จากอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962)

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยสุ่มสมบูรณ์ รวมทั้งสิ้น 16 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 กรรมวิธีในการทดลองที่ 8

BAP (มก/ล) NH$_4$NO$_3$ (เท่า)	0	1.0	2.0	3.0
0	1	2	3	4
1X	5	6	7	8
1 1/2X	9	10	11	12
2X	13	14	15	16

6.8.4 **การบันทึกผล**

ทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1