บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 ต้นพืชทดลองที่ได้จากการขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ

1.2 ตู้กรองอากาศ (laminar air flow)

1.3 ชั้นสำหรับวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.4 เครื่องเขย่า

1.5 เครื่องฝานเนื้อเยื่อ (microtome)

1.6 เครื่องชั่งชนิดละเอียด (analytical balance)

1.7 เครื่องชั่งไฟฟ้า (electrical balance)

1.8 กล้องจุลทรรศน์ (dissecting microscope)

1.9 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง

1.10 หม้อนึ่งความดันไอ

1.11 เตาไฟฟ้า

1.12 ขวดรูปชมพู่ (erlenmyer flask) ขนาด 125 มล

1.13 หลอดทดลองขนาด 25 x 150 มม

1.14 ปิเปต

1.15 บีกเกอร์

1.16 กระบอกวัดปริมาตร

1.17 กรวยแก้ว

1.18 จานเลี้ยงเชื้อ

1.19 ช้อนตักสาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.20 ขวดใส่สารละลายเข้มข้น

1.21 วัสดุที่ใช้ในตู้กรองอากาศ ได้แก่

1.21.1 ด้ามมีดผ่าตัด

1.21.2 ใบมีดผ่าตัดเบอร์ 10

1.21.3 ใบมีดโกนที่ตัดเป็นใบมีดเล็กขนาด 2 x 10 มม

1.21.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.21.5 ปากคีบ (forceps) ขนาดยาว 140 และ 180 ซม

1.21.6 แผ่นพลาสติกตัดเป็นแผ่นสี่เหลี่ยมขนาด 70x90 มม

1.21.7 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 3

1.21.8 หลอดทดลองใส่แอลกอฮอล์

1.22 วัสดุอื่น ๆ เช่น กระดาษอลูมินัม (aluminum foil) ยางรัดของ แผ่นป้ายเขียนกรรมวิธี ฯลฯ

1.23 น้ำกลั่นซึ่งกลั่นจากเครื่องแก้ว

2. สารเคมี

2.1 สารที่ใช้ทำความสะอาดฆ่าเชื้อ

2.1.1 Ethanol เข้มข้น 70%

2.1.2 Clorox ของบริษัท The Clorox Co., Oakland USA.

2.2 สารใช้สำหรับเตรียมอาหาร

2.2.1 เกลือให้ธาตุอาหารหลักต่าง ๆ ตามสูตร MS (1962)

2.2.2 เกลือให้ธาตุอาหารรองต่าง ๆ ตามสูตร MS (1962)

2.2.3 วิตามินต่าง ๆ ตามสูตร MS (1962)

2.2.4 Ferrous sulfate ของบริษัท J.T.Baker Chemical Co., Philipsburg N.J., USA.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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

2.2.6 สารควบคุมการเจริญของพืช

2.2.6.1 Napthalene acetic acid (NAA) ของบริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.

2.2.6.2 6-Furfuryl aminopurine (kinetin) ของบริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.

2.2.6.3 Benzyl amino purine (BAP) ของบริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.

2.2.6.4 Giberellic acid (GA_3) ของบริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.

2.2.7 Potassium iodide 1N

2.2.8 Hydrochloric acid 1N

2.2.9 น้ำกลั่น

2.2.10 ผงวุ้น ตราเฮลิคอปเตอร์

2.3 สารที่ใช้ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

2.3.1 Ethanol เข้มข้น 70 และ 95%

2.3.2 Butanol

2.3.3 Glacial acetic acid

2.3.4 Formalin

2.3.5 Xylol

2.3.6 Parafin oil

2.3.7 Parafin

2.3.8 สี Haematoxylin

2.3.9 น้ำยา Canada balsum

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การเตรียมต้นพืชทดลอง

ต้นพืชทดลองที่ใช้ในการศึกษานี้ได้มาจากการขยายพันธุ์เริ่มแรกจากตาข้างที่เริ่มงอกของหัวพันธุ์ (tuburous rhizome) กระเจียวแดง ซึ่งปลูกเลี้ยงเป็นการรวบรวมพันธุ์พืชสกุลกระเจียวในเรือนเพาะชำ หมวดวิชาไม้ดอกไม้ประดับ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (ภาพที่ 2 หน้า 30)

ภาพที่ 2 กระเจียวแดง (Curcuma roscoeana Wall.) ที่ปลูกในเรือนเพาะชำ หมวดวิชาไม้ดอกฯ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตัดเอาตาข้างที่มีขนาดยาวไม่เกิน 15 มม จากหัวพันธุ์ (ภาพที่ 3 หน้า 31) มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำ แล้วตัดเอาส่วนที่สกปรกออก ลอกกาบใบที่หุ้มอยู่ด้านนอกออกทิ้งไป 2 ชั้น ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวนอกของตาครั้งที่ 1 โดยจุ่มตาลงในแอลกอฮอล์ เข้มข้น 70% นาน 30 วินาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง แล้วทำการฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 โดยนำตาไปแช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ที่มีความเข้มข้น 10% เป็นเวลานาน 15 นาที หลังจากนั้นจึงนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ในตู้ปลอดเชื้อ นำตาข้างของกระเจียวแดงที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วนี้มาตัดใต้กล้องจุลทรรศน์ซึ่งตั้งอยู่ในตู้ปลอดเชื้อโดยลอกกาบใบที่หุ้มตาอยู่ออกทีละชั้น โดยเริ่มแรกใช้

ภาพที่ 3 หัวพันธุ์กระเจียวแดงที่มีตาเพิ่งงอก

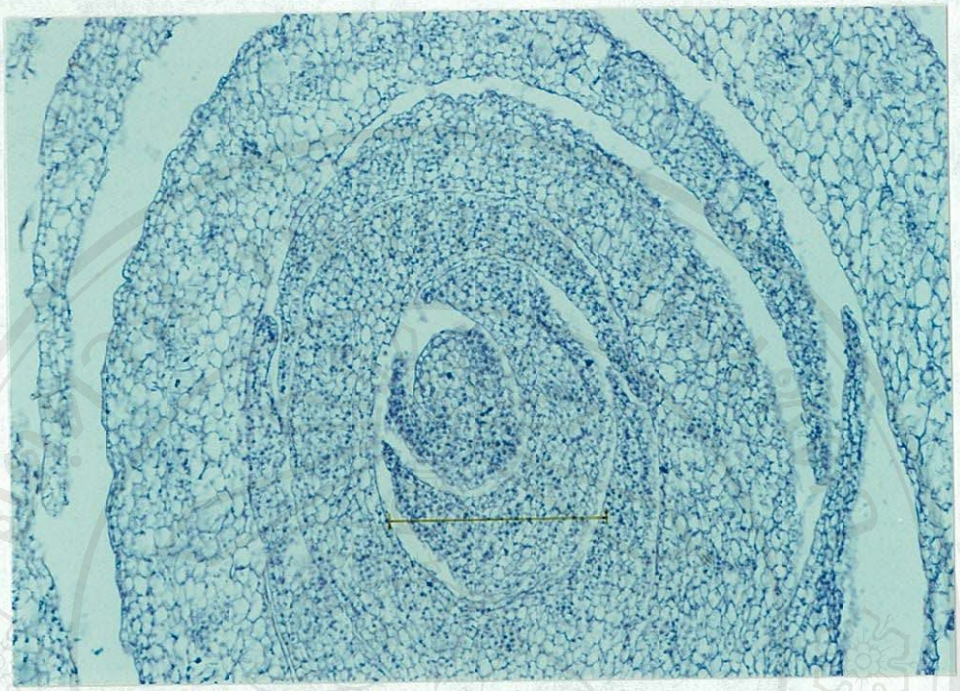
กำลังขยาย 12.5x (เท่า) ก่อนจากนั้นจึงเพิ่มกำลังขึ้นเป็น 25 หรือ 50x ตามความเหมาะสม ลอกกาบใบอ่อนออกประมาณ 4-5 ชั้น จนได้ส่วนของปลายยอด(shoot tip) ขนาด 0.5x1 มม ซึ่งประกอบไปด้วยหน่วยเติบโตของยอดและใบอ่อนมาก (leaf primordia) 1 คู่ (ภาพที่ 4,5 หน้า 32, 33) แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม kinetin 0.25 มก/ล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 4 ภาพตัดตามยาวของตาข้างกระเจี๊ยวแดง (40x)

⟷ คือส่วนที่ใช้ในการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 5 ภาพตัดตามขวางของตาข้างกระเจียวแดง (71x)

⟝⟞ คือส่วนที่ใช้ในการทดลอง

(ส่วนประกอบของอาหาร ดูตารางที่ 1-5) ในหลอดทดลอง โดยสภาพการเลี้ยงเริ่มแรกนี้มีความเข้มแสงประมาณ 500 ลักซ์ (lux) 24 ชม/วัน อุณหภูมิ 28 ± 2°ซ หลังจากนั้นเมื่อปลายยอดมีการพัฒนาเป็นต้นสูง 70-80 มม และมีรากก็ทำการตัดให้มีความสูงประมาณ 10 มม แล้วแบ่งต้นออกเป็น 2 ส่วนตามยาว ตัดรากทิ้งไป ตามวิธีการของเมทินี (2527) การตัดแบ่งต้นครั้งแรกนี้ทำเมื่อต้นพืชมีอายุประมาณ 14 สัปดาห์ ซึ่งพบว่าเป็นต้นที่แข็งแรงและเหมาะสมสำหรับการตัด (การเจริญจากตาจนกระทั่งเป็นต้นดูจากแผนภาพผนวกที่ 1, 2 หน้า 177, 178) การตัดแบ่งครั้งต่อไปทำเมื่อต้นพืชมีอายุ 8 สัปดาห์ แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารที่เพิ่มปริมาณ kinetin เป็น 0.5 มก/ล นำไปเก็บไว้บนชั้นสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งติดหลอดฟลูออเรสเซนต์ขนาดกำลัง 40 วัตต์ (watt) ชั้นละ 3 หลอด วางหลอดห่างกัน 200 มม และอยู่สูงจากเนื้อเยื่อทดลอง 300 มม ทำให้ได้รับความเข้มแสงประมาณ 2,000 ลักซ์ ระยะเวลาให้แสง 16 ชม/วัน เมื่อต้นพืชเพิ่มปริมาณมากขึ้น ก็ย้ายลงในขวดปากกว้างขนาด 75x120 มม แทนหลอดทดลองเพื่อขยายปริมาณโดยเลี้ยง 20 ชิ้น/ขวด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution)

4.1 การเตรียมธาตุอาหารหลัก

เตรียมธาตุอาหารหลักที่ใช้ในสูตร MS (1962) แยกกัน โดยให้แต่ละชนิดมีความเข้มข้น 1M ทำการเตรียมน้ำยาชนิดละ 200 มล โดยใช้ปริมาณสารดังต่อไปนี้

ตารางที่ 1 ชนิดและปริมาณของสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร MS (1962)

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

4.2 การเตรียมธาตุอาหารรอง

เตรียมธาตุอาหารรองสูตร MS (1962) ดัดแปลง โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกันความเข้มข้นของสารมากกว่าที่ใช้จริง 100x เตรียมน้ำยาให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 ชนิดและปริมาณของสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรองสูตร MS(1962) ดัดแปลง

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS(1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาเข้มข้น ปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล (มก)
$CuSo_4 \cdot 5H_2O$	0.025	2.5
KI	0.830	83
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.600	860
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22.300	2,230
H_3BO_3	6.200	620
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.250	25
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025	2.5

4.3 การเตรียมวิตามิน

เตรียมวิตามินในสูตร MS(1962) ดัดแปลง โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน ปริมาณของสารมากกว่าที่ใช้จริง 100x โดยละลายน้ำรวมกันให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3 ชนิดและปริมาณของสารละลายเข้มข้นของวิตามินสูตร MS(1962) ดัดแปลง

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS(1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาเข้มข้น ปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล (มก)
glycine	2	200
myo-inositol	100	10,000
thiamine.HCl	0.25	25
pyridoxin .HCl	0.25	25
nicotinic acid	0.25	25

4.4 การเตรียมสารละลายเหล็กในรูป FeEDTA

เตรียม FeEDTA ในสูตร MS(1962) ซึ่งประกอบไปด้วย $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ และ $Na_2EDTA.2H_2O$ โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน ปริมาณของสารมากกว่าที่ใช้จริง 100x ทำการเตรียมโดยชั่งสารแต่ละชนิดละลายในน้ำให้มีปริมาตรสุดท้ายของแต่ละส่วน 500 มล แล้วจึงนำมาผสมไว้ในขวดเดียวกัน ทำการหุ้มขวดด้วยกระดาษอลูมินัมให้มิดชิดเพื่อป้องกันแสง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4 ชนิดและปริมาณของสารละลายเหล็กเข้มข้น สูตร MS(1962)

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

4.5 การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต

4.5.1 การเตรียม kinetin

ชั่ง kinetin 10 มก ละลายด้วยสารละลาย 1N KOH (potasium hydroxide) เล็กน้อยเพียงพอให้ละลายได้แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 200 มล ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริงดูรายละเอียดจากแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในการทดลอง

4.5.2 การเตรียม NAA

ชั่ง NAA 1 มก ละลายด้วย absolute ethanol เล็กน้อยแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริง ดูรายละเอียดจากแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในการทดลอง

4.5.3 การเตรียม GA_3

ชั่ง GA_3 10 มก ละลายด้วย absolute ethanol เช่นเดียวกับการเตรียม NAA แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 200 มล ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริง ดูรายละเอียดจากแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในการทดลอง

4.5.4 การเตรียม BAP

ชั่ง BAP 10 มก ละลายด้วย 1N KOH เช่นเดียวกับการเตรียม kinetin แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 200 มล ด้วยน้ำกลั่นสำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริง ดูรายละเอียดจากแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การเตรียมอาหารพื้นฐานสูตร MS(1962)

นำส่วนประกอบของอาหารพื้นฐานสูตร MS(1962) จากน้ำยาเข้มข้นที่เตรียมในข้อ 4 มาผสมให้เข้ากัน โดยใช้สารละลายเข้มข้นแต่ละชนิดดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 5 หน้า 39

ขั้นตอนการทำอาหารสูตร MS ทำได้ดังนี้

ใส่น้ำกลั่นลงไปในขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 1,000 มล ประมาณ 1/3 ของขวดแล้วเติมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักแต่ละชนิดลงไป โดยเขย่าขวดให้น้ำยาผสมกันดีระหว่างแต่ละครั้งที่เติม แล้วเพิ่มน้ำกลั่นลงไปอีกเพื่อป้องกันการตกตะกอนก่อนที่จะเติมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรอง วิตามิน เหล็ก และสารควบคุมการเจริญเติบโตลงไปตามลำดับ จากนั้นจึงเติมน้ำกลั่นลงไปอีกจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล เทสารละลายลงในบีกเกอร์ขนาด 2,000 มล นำไปปรับค่าความเป็นกรดให้ได้ 5.7 โดยใช้ 1 N HCl (hydrochloric acid) หรือ 1 N KOH ในการเตรียมเป็นอาหารเหลว หลังจากที่ปรับค่าความเป็นกรดแล้วให้ใส่น้ำตาลซูโครสลงไปแล้วคนให้ละลาย ถ้าเตรียมเป็นอาหารแข็งให้ใส่วุ้นลงไปในสารละลายแล้วนำไปต้มให้วุ้นละลายก่อนที่จะใส่น้ำตาลลงไป ต้มต่อจนน้ำตาลละลาย ต่อจากนั้นตวงอาหารใส่ในขวดทดลองรูปชมพู่ ขนาด 125 มล ปริมาณ 25 มล/ขวด หุ้มปากขวดรูปชมพู่ด้วยพลาสติกขนาด 70 x 90 มม หุ้มทับด้วยกระดาษลอกลายขนาดเดียวกัน แล้วรัดด้วยยางรัดของ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่ 15 ป (ปอนด์)/น^2 (ตารางนิ้ว) นาน 15 น (นาที)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบของสารละลายเข้มข้นแต่ละชนิดในอาหารสูตร MS(1962) ดัดแปลง

ชนิดของสารละลาย	ปริมาณสารละลายเข้มข้นในอาหาร 1 ล (มล)
ธาตุอาหารหลัก	
ความเข้มข้นชนิดละ 1 M	
NH_4NO_3	20.6
KNO_3	18.8
$CaCl_2.2H_2O$	4.0
$MgSO_4.7H_2O$	1.5
KH_2PO_4	1.3
ธาตุอาหารรอง เหล็กและวิตามินความเข้มข้น	
ชนิดละ 100x	
ธาตุอาหารรอง	10
เหล็ก	10
วิตามิน	10
สารควบคุมการเจริญเติบโต	
kinetin (ความเข้มข้น 10 มก ในน้ำยา 200 มล)	10 (ได้ปริมาณ kinetin 0.5 มก/อาหารที่เตรียม 1 ล)

หมายเหตุ สำหรับซูโครสใช้ในปริมาณ 30 ก/ล

วุ้นใช้ในปริมาณ 0 และ 10 ก/ล ในอาหารเหลวและอาหารแข็ง ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. วิธีการวิจัย

6.1 <u>การทดลองที่ 1</u> การเปรียบเทียบความสูงของชิ้นส่วนพืชที่มีผลต่อการแตกหน่อและการเจริญของกระเจียวแดง

6.1.1 อาหาร

ใช้อาหารวุ้นและอาหารเหลวสูตร MS ที่มี kinetin 0.5 มก/ล (วิธีเตรียมดูข้อ 5) โดยเตรียมใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล ปริมาณขวดละ 25 มล

6.1.2 วิธีการทดลอง

ใช้อาหารวุ้นและอาหารเหลวสูตร MS ที่มี kinetin 0.5 มก/ล ร่วมกับการตัดต้นให้มีขนาดต่างกัน แยกวิธีต่าง ๆ ดังนี้

วิธีที่ 1 ตัดต้นให้มีความยาว 5 มม แล้วแบ่งเป็น 1/4 ส่วนตามยาว

วิธีที่ 2 ตัดต้นให้มีความยาว 5 มม แล้วแบ่งเป็น 1/2 ส่วนตามยาว

วิธีที่ 3 ตัดต้นให้มีความยาว 5 มม

วิธีที่ 4 ตัดต้นให้มีความยาว 10 มม แล้วแบ่งเป็น 1/4 ส่วนตามยาว

วิธีที่ 5 ตัดต้นให้มีความยาว 10 มม แล้วแบ่งเป็น 1/2 ส่วนตามยาว

วิธีที่ 6 ตัดต้นให้มีความยาว 10 มม

วิธีที่ 7 ตัดต้นให้มีความยาว 20 มม

วิธีที่ 8 ตัดต้นให้มีความยาว 40 มม

วางแผนการทดลองแบบแฟคตอเรียล โดยสุ่มสมบูรณ์(factorial in completely randomized design) รวมทั้งสิ้น 16 กรรมวิธี (ตารางที่ 6 หน้า 41) แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 6 แสดงกรรมวิธีในการทดลองที่ 1

วิธีการตัด / สภาพอาหาร	5 มม แบ่งเป็น 1/4ส่วน	5 มม แบ่งเป็น 1/2ส่วน	5 มม	10 มม แบ่งเป็น 1/4ส่วน	10 มม แบ่งเป็น 1/2ส่วน	10 มม	20 มม	40 มม
วุ้น	1	2	3	4	5	6	7	8
เหลว	9	10	11	12	13	14	15	16

6.1.3 การบันทึกผล

6.1.3.1 บันทึกการเจริญของต้นดังนี้

6.1.3.1.1 บันทึกวันที่เริ่มเกิดยอด

6.1.3.1.2 วัดความสูงของต้น

6.1.3.1.3 นับจำนวนใบ

6.1.3.1.4 บันทึกจำนวนต้นทั้งหมดเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

6.1.3.1.5 ชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

6.1.3.1.6 บันทึกลักษณะอื่น ๆ เช่น สีของใบที่ผิดปกติและการเกิดแคลลัส

6.1.3.1.7 นำตัวอย่างใบจากต้นที่เลี้ยงบนอาหารวุ้น และในอาหารเหลวไปทำการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาเพื่อดูภาพตัดขวางของใบ

6.1.3.1.8 นำตัวอย่างชิ้นส่วนพืชความยาว 10 มม และแบ่ง 1/2 ส่วนตามยาว ที่เลี้ยงบนอาหารวุ้นไปทำการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา เพื่อดูจุดกำเนิดของยอด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.1.3.2 บันทึกลักษณะการเจริญของรากดังนี้

6.1.3.2.1 บันทึกวันที่เริ่มเกิดราก

6.1.3.2.2 บันทึกจำนวนรากต่อกอ

6.1.3.2.3 วัดความยาวของราก

6.1.3.2.4 ชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของรากเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

6.1.3.2.5 บันทึกลักษณะอื่น ๆ เช่น ความผิดปกติของรากและสีของราก

6.1.3.2.6 นำตัวอย่างชิ้นส่วนพืชความยาว 10 มม และแบ่ง 1/2 ส่วนตามยาว ที่เลี้ยงบนอาหารวุ้นไปทำการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา เพื่อดูจุดกำเนิดของราก

6.2 <u>การทดลองที่ 2</u> การเปรียบเทียบอายุของชิ้นส่วนพืชและสภาพของอาหารที่เหมาะสม สำหรับการเจริญของกระเจียวแดง

6.2.1 อาหาร

อาหารที่ใช้เลี้ยงเหมือนการทดลองที่ 1

6.2.2 วิธีการทดลอง

ทำการทดลองกับ 2 ปัจจัย คือ อายุของต้นพืช และสภาพอาหารที่เลี้ยง

6.2.2.1 ใช้ต้นพืชอายุหลังจากทำการย้ายต้น 2 4 6 และ 8 สัปดาห์ โดยตัดต้นให้มีขนาดยาว 10 มม แล้วแบ่งครึ่งตามยาว

6.2.2.2 สภาพอาหารที่เลี้ยง แยกวิธีต่าง ๆ ดังนี้

วิธีที่ 1 เลี้ยงบนอาหารวุ้นย้ายไปเลี้ยงบนอาหารวุ้น

วิธีที่ 2 เลี้ยงบนอาหารวุ้นย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลว

วิธีที่ 3 เลี้ยงในอาหารเหลวย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลว

วิธีที่ 4 เลี้ยงในอาหารเหลวย้ายไปเลี้ยงบนอาหารวุ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วางแผนการทดลองแบบแฟคตอเรียล โดยสุ่มสมบูรณ์ รวมทั้งสิ้น 16 กรรมวิธี (ตารางที่ 7 หน้า 43) แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ

ตารางที่ 7 แสดงกรรมวิธีในการทดลองที่ 2

สภาพอาหาร / อายุของต้นพืช (สัปดาห์)	อาหารวุ้นย้ายไปอาหารวุ้น	อาหารวุ้นย้ายไปอาหารเหลว	อาหารเหลวย้ายไปอาหารเหลว	อาหารเหลวย้ายไปอาหารวุ้น
2	1	2	3	4
4	5	6	7	8
6	9	10	11	12
8	13	14	15	16

6.2.3 การบันทึกผล

6.2.3.1 บันทึกลักษณะการเจริญของต้นเหมือนการทดลองที่ 1 ตามข้อ 6.1.3.1.1 - 6.1.3.1.6

6.2.3.2 บันทึกลักษณะการเจริญของรากเหมือนการทดลองที่ 1 ตามข้อ 6.1.3.2.1 - 6.1.3.2.5

6.3 <u>การทดลองที่ 3</u> ผลของ NAA และ kinetin ที่มีต่อการแตกหน่อและการเจริญของรากในอาหารเหลว

6.3.1 อาหาร

ใช้อาหารเหลวสูตร MS (วิธีเตรียมดูข้อ 5) แต่สารควบคุมการเจริญที่ใช้มี 2 ชนิดคือ NAA และ kinetin (วิธีเตรียมดูข้อ 4.5.1 และ 4.5.2) โดยปรับระดับของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

NAA เป็น 0 และ 0.05 มก/ล ส่วน kinetin ปรับให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วง 0-8 มก/ล ใช้ภาชนะและปริมาณของอาหาร/ขวด เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

6.3.2 วิธีการทดลอง

ทำการทดลองความเข้มข้นของ NAA 2 ระดับคือ 0 และ 0.05 มก/ล ร่วมกับ kinetin 7 ระดับ คือ 0 0.25 0.5 1.0 2.0 4.0 และ 0.8 มก/ล โดยตัดชิ้นส่วนพืชทดลองให้มีความสูง 10 มม แล้วแบ่งครึ่งตามยาว

วางแผนการทดลองแบบแฟคตอเรียล โดยสุ่มสมบูรณ์ รวมทั้งสิ้น 14 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ (ตารางที่ 8 หน้า 44)

ตารางที่ 8 แสดงกรรมวิธีในการทดลองที่ 3

NAA (มก/ล) \ kinetin (มก/ล)	0	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0
0	1	2	3	4	5	6	7
0.05	8	9	10	11	12	13	14

6.3.3 การบันทึกผล

6.3.3.1 บันทึกลักษณะการเจริญของต้นเหมือนการทดลองที่ 1 ตามข้อ 6.1.3.1.1 - 6.1.3.1.4 และ 6.1.3.1.6

6.3.3.2 บันทึกลักษณะการเจริญของรากเหมือนการทดลองที่ 1 ตามข้อ 6.1.3.2.1 - 6.1.3.2.3 และ 6.1.3.2.5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.4 <u>การทดลองที่ 4</u> ผลของ BAP ที่มีต่อการแตกหน่อและการเจริญของรากในอาหารเหลว

6.4.1 อาหาร

ใช้อาหารเหลวสูตร MS (วิธีการเตรียมดูข้อ 5) โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BAP แทน kinetin ที่ใช้ในการทดลองที่ 3 (วิธีการเตรียมดูข้อ 4.5.4)ปรับ BAP ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วง 0-8.0 มก/ล ขนาดของภาชนะและปริมาณของอาหาร/ขวด ใช้เหมือนกับการทดลองที่ 1

6.4.2 วิธีการทดลอง

ตัดต้นพืชทดลองให้มีความสูง 10 มม แล้วแบ่งครึ่งตามยาว

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) รวม 9 กรรมวิธี โดยแต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1	BAP	0	มก/ล
กรรมวิธีที่ 2	BAP	0.05	มก/ล
กรรมวิธีที่ 3	BAP	0.125	มก/ล
กรรมวิธีที่ 4	BAP	0.25	มก/ล
กรรมวิธีที่ 5	BAP	0.5	มก/ล
กรรมวิธีที่ 6	BAP	1.0	มก/ล
กรรมวิธีที่ 7	BAP	2.0	มก/ล
กรรมวิธีที่ 8	BAP	4.0	มก/ล
กรรมวิธีที่ 9	BAP	8.0	มก/ล

6.4.3 การบันทึกผล

บันทึกผลเหมือนกับการทดลองที่ 2

6.5 <u>การทดลองที่ 5</u> ผลของ GA_3 ที่มีต่อการเจริญของชิ้นส่วนพืชที่เลี้ยงในอาหารเหลว

6.5.1 อาหาร

ใช้อาหารเหลวสูตร MS (วิธีการเตรียมดูข้อ 5) ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ kinetin และ GA_3 (วิธีการเตรียมดูข้อ 4.5.3) โดยใช้ kinetin ใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ระดับ 0.25 มก/ล ส่วน GA_3 ปรับให้มีระดับต่าง ๆ ในช่วง 0-8.0 มก/ล ขนาดของภาชนะที่ใช้และปริมาณของอาหาร/ขวด เหมือนกับการทดลองที่ 1

6.5.2 วิธีการทดลอง

ตัดชิ้นส่วนให้มีขนาดเดียวกับการทดลองที่ 2 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์รวม 7 กรรมวิธี โดยแต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1	GA_3	0	มก/ล
กรรมวิธีที่ 2	GA_3	0.25	มก/ล
กรรมวิธีที่ 3	GA_3	0.5	มก/ล
กรรมวิธีที่ 4	GA_3	1.0	มก/ล
กรรมวิธีที่ 5	GA_3	2.0	มก/ล
กรรมวิธีที่ 6	GA_3	4.0	มก/ล
กรรมวิธีที่ 7	GA_3	8.0	มก/ล

6.5.3 การบันทึกผล

บันทึกผลเหมือนกับการทดลองที่ 2

6.6 <u>การทดลองที่ 6</u> ผลของระดับไนโตรเจนในอาหารที่มีต่อการเจริญของชิ้นส่วนพืชที่เลี้ยงในอาหารเหลว

6.6.1 อาหาร

ใช้อาหารเหลวสูตร MS (วิธีการเตรียมดูข้อ 5) แต่ปรับระดับ KNO_3 และ NH_4NO_3 ในส่วนของธาตุอาหารหลักให้มีความเข้มข้นระดับต่าง ๆ 4 ระดับ โดยให้แต่ละตัวมีความเข้มข้น 1/2 1 1 1/2 และ 2x (เท่า) ของระดับปกติในอาหารสูตร MS (ตารางที่ 9 หน้า 47) และใช้ kinetin ความเข้มข้น 0.25 มก/ล เท่ากัน ทุกกรรมวิธี ภาชนะและปริมาณของอาหาร/ขวด ใช้เหมือนกับการทดลองที่ 1

6.6.2 วิธีการทดลอง

ตัดชิ้นส่วนพืชทดลองให้มีขนาดเดียวกับการทดลองที่ 2

วางแผนการทดลองแบบแฟคตอเรียล โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์รวม 16 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 9 แสดงกรรมวิธีในการทดลองที่ 6

KNO_3 \ NH_4NO_3	1/2x	1x	1 1/2x	2x
1/2x	1	2	3	4
1x	5	6	7	8
1 1/2x	9	10	11	12
2x	13	14	15	16

6.6.3 การบันทึกผล

บันทึกผลเหมือนกับการทดลองที่ 2

6.7 <u>การทดลองที่ 7</u> ผลของระดับน้ำตาลและน้ำมะพร้าวที่มีต่อการเจริญของชิ้นส่วนที่เลี้ยงในอาหารเหลว

6.7.1 อาหาร

ใช้อาหารเหลวสูตร MS ที่มี kinetin 0.25 มก/ล (วิธีการเตรียมดูข้อ 5) แต่เพิ่มและปรับปริมาณน้ำมะพร้าวและน้ำตาลให้มีความเข้มข้นระดับต่าง ๆ โดยใช้น้ำมะพร้าวในระดับต่าง ๆ ในช่วง 0-20 % (ปริมาตร/ปริมาตร) ส่วนน้ำตาลปรับให้มีระดับต่าง ๆ ตั้งแต่ 2-5 % ภาชนะที่ใช้และปริมาณอาหาร/ขวด ใช้เหมือนกับการทดลองที่ 1

6.7.2 วิธีการทดลอง

ทำการทดลองความเข้มข้นของน้ำมะพร้าว 3 ระดับ คือ 0 10 และ 20 % (ปริมาตร/ปริมาตร) ร่วมกับน้ำตาล 3 ระดับ คือ 2 3 และ 5 % (ตารางที่ 10 หน้า 48) โดยตัดต้นพืชทดลองให้มีขนาดเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2

วางแผนการทดลองแบบแฟคตอเรียล โดยสุ่มสมบูรณ์รวม 9 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 10 แสดงกรรมวิธีในการทดลองที่ 7

น้ำตาล (%) \ น้ำมะพร้าว (%)	0	10	20
2	1	2	3
3	4	5	6
5	7	8	9

6.7.3 การบันทึกผล

บันทึกผลเหมือนกับการทดลองที่ 2

ชิ้นส่วนพืชที่ใช้ในการทดลองที่ 1-7 ได้จากการเลี้ยงต้นบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี kinetin 0.5 มก/ล เมื่อต้นมีอายุ 8 สัปดาห์ สูง 8-10 ซม มีใบประมาณ 3 ใบ และมีราก ยาว 3-5 ซม จำนวน 4-6 ราก ดังได้อธิบายไว้ในข้อ 3

สภาพแสงและอุณหภูมิที่ใช้ในทุกการทดลองเหมือนกันคือ ถ้าเป็นอาหารวุ้นจะนำภาชนะไปวางบนชั้นวางเนื้อเยื่อที่ติดหลอดฟลูออเรสเซนต์ 3 หลอด โดยมีระยะห่างจากหลอดถึงชั้นวาง 45 ซม และให้ความเข้มแสงที่ระดับชิ้นส่วนพืชประมาณ 1,500 ลักซ์ ตลอด 24 ชม ส่วนการเลี้ยงในอาหารเหลวจะวางภาชนะบนเครื่องเขย่า ซึ่งมีอัตราความเร็ว 100 รอบ/นาที ชิ้นส่วนที่เลี้ยงได้รับความเข้มแสงประมาณ 1,500 ลักซ์ และให้แสงตลอด 24 ชม เช่นกัน อุณหภูมิห้องที่เลี้ยงชิ้นส่วนพืชทดลองเฉลี่ย 28 $\pm$ 2 °ซ ตลอดกลางวันและกลางคืน

6.8 <u>การทดลองที่ 8</u> การหาเปอร์เซนต์รอดตายของต้นที่ย้ายปลูกในกระถาง

6.8.1 พืชทดลอง

ใช้ต้นกระเจี๊ยวแดง ซึ่งได้จากการขยายพันธุ์บนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี kinetin 0.5 มก/ล เหมือนกับต้นที่ใช้สำหรับเตรียมต้นพืชทดลองในข้อ 3 จำนวน 20 ต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.8.2 เครื่องปลูกและภาชนะปลูก

ใช้ทรายที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ป/น^2 ใส่ในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 น

6.8.3 วิธีการย้ายปลูก

เมื่อย้ายต้นกระเจียวแดงลง กระถางละ 10 ต้น แล้วใช้ถุงพลาสติกขนาด 10 x 15 น หุ้มกระถางไว้ โดยถุงที่ใช้เจาะรูขนาด 2 ซม 5 รู ที่บริเวณใกล้ปากถุงเพื่อช่วยระบายอากาศและความร้อน ใส่น้ำลงไปก้นถุงให้สูงประมาณ 1 น ปิดปากถุงพลาสติกไว้เพื่อรักษาความชื้นในระยะแรก หลังจากนั้น 3 วัน เทน้ำที่อยู่ก้นถุงออก พร้อมทั้งค่อย ๆ เปิดปากถุงออก ใช้การพ่นฝอยด้วยน้ำช่วยบ้าง วันละ 3 ครั้ง ต่อมาอีก 3-4 วัน จึงนำถุงพลาสติกที่หุ้มกระถางออกหมด ในระยะนี้อาจพ่นฝอยด้วยน้ำบ่อยขึ้นพร้อมทั้งคอยรดน้ำด้วยบัวฝอยให้ทรายในกระถางชื้นอยู่เสมอ ในระยะย้ายปลูกให้ต้นอ่อนได้รับแสงประมาณ 3,000 ลักซ์ โดยได้รับแต่แสงธรรมชาติแต่เพียงอย่างเดียว

6.8.4 การบันทึกผล

นับจำนวนต้นที่รอดตายโดยคิดเป็นเปอร์เซนต์ หลังจากย้ายออกปลูกในกระถางได้ 2 สัปดาห์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved