บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 หวายลูกผสม 2 สายพันธุ์ คือ *Dendrobium* Thai Siri X *Dendrobium* Thai Jewel และ *Dendrobium* Thai Siri X *Dendrobium* Thai Compactum (ภาพ 1 และ 2)

1.2 ตู้กรองอากาศบริสุทธิ์ (laminar air flow)

1.3 ชั้นสำหรับวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีระบบให้แสงสว่างแบบหลอดฟลูออเรสเซนส์

1.4 ตู้ควบคุมอุณหภูมิสำหรับวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีระบบให้แสงสว่างแบบหลอดฟลูออเรสเซนต์ ให้ความเข้มแสงประมาณ 2,000 ลักซ์

1.5 เครื่องชั่งไฟฟ้า ชนิดทศนิยม 3 ตำแหน่ง

1.6 เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง

1.7 ตะแกรงสำหรับวางหลอดเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 40 หลอด

1.8 เครื่องเขย่า

1.9 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง

1.10 หม้อนึ่งความดันไอ

1.11 เตาไมโครเวฟ

1.12 ขวดปรับปริมาตรขนาด 100, 500 และ 1,000 มล.

1.13 ขวดรูปชมพู่ (erlenmayer flask) ขนาด 50, 125 และ 250 มล.

1.14 บีกเกอร์ขนาด 10, 50, 100, 1,000, และ 2,000 มล.

1.15 กระบอกตวงวัดปริมาตรขนาด 10, 50 และ 100 มล.

1.16 ปิเปตขนาด 0.5, 1, 2, 5, 10, 25 และ 50 มล.

1.17 ขวดใส่สารละลายเข้มข้นขนาด 1,000 มล.

1.18 หลอดแก้วขนาด 25 x 10 มล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.19 ช้อนตักสาร

1.20 แท่งแก้วสำหรับคนสารละลาย

1.21 วัสดุที่ใช้ในตู้กรองอากาศบริสุทธิ์ ได้แก่

1.21.1 ด้ามมีดผ่าตัดเบอร์ 3

1.21.2 ใบมีดผ่าตัดเบอร์ 10 และ 11

1.21.3 ใบมีดโกนที่ตัดเป็นใบมีดเล็กขนาด 2 x 10 มม.

1.21.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.21.5 ปากคีบขนาดยาว 140 และ 180 มม.

1.21.6 ถุงพลาสติกทนร้อนตัดเป็นแผ่นสี่เหลี่ยมขนาด 70 x 90 มม.

1.21.7 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 3

1.21.8 หลอดทดลองขนาด 25 x 150 มม.

1.21.9 จานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 95 และ 140 มม.

1.21.10 บีกเกอร์ขนาด 50 มม. และขวดสำหรับวางหลอดทดลองสำหรับใส่แอลกอฮอล์

1.22 วัสดุอื่น ๆ เช่น ยางรัด แผ่นป้าย (label) กระดาษซับน้ำ แผ่นอลูมิเนียม (aluminum foil) กระดาษลอกลาย แผ่นเมมเบรนขนาดรู 0.22 ไมครอน สำหรับกรองฮอร์โมนที่ไม่สามารถนึ่งฆ่าเชื้อได้

1.23 น้ำกลั่น

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับฆ่าเชื้อ

2.1.1 เอทธานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์

2.1.2 น้ำยาคลอร็อกซ์ ของบริษัท The Clorox Co., U.S.A.

2.1.3 สารจับใบ Tween 20 ของบริษัท สากลเคมีภัณฑ์และการค้า จำกัด

2.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมอาหาร

2.2.1 เกลือให้ธาตุอาหารหลักต่าง ๆ ตามสูตร VW (1949)

2.2.2 เกลือให้ธาตุอาหารหลักต่าง ๆ ตามสูตร MS (1962)

2.2.3 สารอินทรีย์ต่าง ๆ ตามสูตร MS (1962)

2.2.4 เกลือให้ธาตุอาหารรองต่าง ๆ ตามสูตร MS (1962)

2.2.5 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.5.1 N^6 - benzyladenine (BA) ของบริษัท Fluka Chemical , Switzerland.

2.2.5.2 Abscisic acid (ABA) ของบริษัท Sigma Chemical , U.S.A.

2.2.5.3 Spermidine ของบริษัท Sigma Chemical , U.S.A.

2.2.5.4 5 - azacytidine ของบริษัท Sigma Chemical , U.S.A.

2.2.5.5 Gibberellic acid (GA_3) ของบริษัท Sigma Chemical , Switzerland.

2.2.5.6 โปแตสเซียมคลอเรท ($KClO_3$)

2.2.6 น้ำตาลทรายขาว ของ บริษัท มิตรผล จำกัด

2.2.7 ผงวุ้นตราเฮลิคอปเตอร์

2.2.8 โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มอล (1N KOH)

2.2.9 กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล (1N HCl)

2.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

2.3.1 เอทธานอล ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์

2.3.2 Glacial acetic acid

2.3.3 Formalin

2.3.4 TBA (tertiary - butyl alcohol)

2.3.5 Absolute alcohol

2.3.6 สี Erythrosin

2.3.7 Paraffin

2.3.8 Liquid paraffin

2.3.9 Xylene

2.3.10 สี Hematoxylin

2.3.11 น้ำยา Canada balsum

2.4 ชุดตรวจสอบความบริสุทธิ์โพแทสเซียมคลอเรท พัฒนาโดยภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3. การเตรียมพืชสำหรับทดลอง

3.12 การเตรียมต้นกล้วยไม้เพื่อใช้ในการทดลองที่ 1

นำหน่อกล้วยไม้ที่เกิดขึ้นใหม่และปลายใบยังไม่เปิด ความยาวประมาณ 5 - 8 ซม.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลอกกาบใบออกอีก 4 ชั้นล้างผ่านน้ำประปา และเปิดกาบใบออกทีละชั้นและฆ่าเชื้อโดยเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วตามด้วยคลอร็อกซ์ 12 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นตัดตาออกจากหน่อเป็นชิ้นขนาด 2 X 2 มม. บนอาหารเพื่อเพิ่มปริมาณต้น สูตร MS (1962) ที่มีความเข้มข้นของ BA 0.5 มก/ล. GA_3 0.05 มก/ล. เลี้ยงนาน 1 เดือนเพื่อให้แตกยอดจำนวนมาก และเมื่อมีจำนวนต้นครบสำหรับการทดลองแล้ว เลี้ยงต้นจนมีความสูงประมาณ 3 - 4 ซม. และมีใบ 4 ใบ และมีราก นำไปเลี้ยงในสภาพที่มีความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ให้แสง 24 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 26 $\pm$ 2 ^{o}ซ เป็นเวลาประมาณ 3 เดือน นำต้นไปทดลองต่อไป

3.13 การเตรียมต้นเพื่อใช้ในการทดลองที่ 2

นำต้นที่มีความสูงประมาณ 3 - 4 เซนติเมตร มีใบ 4 ใบ และมีราก มาวางเลี้ยงบนอาหารชักนำดอก สูตร MS (1962) ที่มีความเข้มข้นของ BA 0.02 มลม. และน้ำตาล 60 ก/ล. โดยตัดรากออกหมด และนำไปเลี้ยงในสภาพที่มีความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ให้แสง 24 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 26 $\pm$ 2 ^{o}ซ เป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นจึงนำต้นไปทำการทดลองต่อไป

4. **การเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution)**

4.12 การเตรียมธาตุอาหารหลัก

เตรียมธาตุอาหารหลักที่ใช้ในสูตร MS (1962) และ สูตร VW (1949) ความเข้มข้น 10 เท่า (10X) โดยชั่งสารแต่ละชนิดในตาราง 2 และ 3 ตามลำดับ โดยละลายสารทีละชนิดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 1,000 มล. แล้วเทใส่ขวดเก็บสารละลายเข้มข้นปิดฝาเก็บในตู้เย็น (ตาราง 2, 3, 4 , 5 และ6)

ตาราง 2 ชนิด และปริมาตรสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962)(มก/ล.)	ปริมาณสารในน้ำยาเข้มข้น 10 X (ก/ล.)
NH_4NO_3	1,650	16.50
KNO_3	1,900	19.00
$CaCl_2.2H_2O$	44	0.44
$MgSO_4.7H_2O$	370	3.70
KH_2PO_4	170	1.70

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3 ชนิด และปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร VW (1949)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร VW (1949) (มก/ล.)	ปริมาณสารในน้ำยาเข้มข้น 10 X (ก/ล.)
$(NH_4)_2SO_4$	500	5.00
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	200	2.00
$MgSO_4.7H_2O$	250	2.50
KH_2PO_4	250	2.50
KNO_3	525	5.25

4.2 การเตรียมธาตุอาหารรอง

เตรียมธาตุอาหารรองสูตร MS (1962) โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกันให้ความเข้มข้นของสารเป็น 100X เตรียมน้ำยาให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล. โดยใช้น้ำหนักของสารดังแสดงในตาราง 4

ตาราง 4 ชนิด และปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรองสูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962)(มก/ล.)	ปริมาณสารในน้ำยาข้มข้น 100X (มก/ล.)
$CuSO_4.5H_2O$	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_4	6.200	620.0
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	25.0
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	2.5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3 การเตรียมสารอินทรีย์

การเตรียมสารอินทรีย์สูตร MS (1962) ทำเป็นสารละลายเข้มข้น รวมไว้ในขวดเดียวกันให้ความเข้มข้นของสารเป็น 100X เตรียมน้ำยาให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล. โดยใช้น้ำหนักของสารดังแสดงใน ตาราง 5

ตาราง 5 ชนิด และปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของสารอินทรีย์สูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962)(มก/ล.)	ปริมาณสารในน้ำยาเข้มข้น 100X (มก/ล.)
Glycine	2.00	200
Thiamine.HCl	0.25	25
Pyridoxine.HCl	0.25	25
Nicotinic acid	0.25	25
Myo - inositol	100	10,000

4.4 การเตรียมสารละลายเหล็กเข้มข้น

เตรียม FeEDTA สูตร MS (1962) ซึ่งประกอบด้วย $FeSO_4.7H_2O$ และ $Na_2EDTA.2H_2O$ โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นของสารเป็น 100X เตรียมน้ำยาให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร เตรียมโดยชั่งแต่ละชนิดละลายน้ำให้มีปริมาตรสุดท้ายของแต่ละส่วนเป็น 500 มล. (ตาราง 6) แล้วจึงนำมาผสมไว้ในขวดเดียวกันโดยเก็บไว้ในขวดสีชาเพื่อป้องกันแสง

ตาราง 6 ชนิด และปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของเหล็กสูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตรMS (1962)(มก/ล.)	ปริมาณสารในน้ำยาเข้มข้น 100X(ก/ล.)
$FeSO_4.7H_2O$	27.8	2.78
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.3	3.73

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.6 การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต และสารเคมีอื่น ๆ

4.6.1 การเตรียม BA โดยการชั่ง BA 32 มก. ละลายด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มอล ประมาณ 2 - 3 หยด เพียงพอให้สารละลายจนหมดแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริงดูรายละเอียดในแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในการทดลอง

4.6.2 การเตรียม ABA โดยการชั่ง ABA 2 มก. ละลายด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มอล ประมาณ 2 - 3 หยด เพียงพอให้สารละลายจนหมดแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริงดูรายละเอียดในแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในการทดลอง

4.6.3 การเตรียม GA_3 โดยการชั่ง GA_3 2 มก. ละลายด้วย Absolute alcohol ประมาณ 2 - 3 หยด เพียงพอให้สารละลายจนหมดแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริงดูรายละเอียดในแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในการทดลอง

4.6.4 การเตรียม spermidine โดยการชั่ง 0.5808 มก. ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล. (4 มลม.) สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริงดูรายละเอียดในแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในการทดลอง

4.6.5 การเตรียม 5 - azacytidine โดยการชั่ง 0.219 มก. ละลายน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล. (900 มคม.) สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริงดูรายละเอียดในแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในการทดลอง

4.6.6 การเตรียมโปแทสเซียมคลอเรท โดยการชั่ง 2 ก. ละลายน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล. สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริงดูรายละเอียดในแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในการทดลอง

5. การเตรียมอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962)

นำส่วนประกอบของอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962) จากน้ำยาเข้มข้นที่เตรียมไว้ในข้อ 4 มาผสมให้เข้ากัน โดยใช้สารละลายเข้มข้นแต่ละชนิดดังที่แสดงไว้ในตาราง 7 ขั้นตอนการเตรียมสูตรอาหาร MS (1962) ทำดังนี้

5.1 ใส่น้ำกลั่นลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มล. ประมาณ 1/3 ของขวดแล้วเติมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักลงไปทีละชนิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.2 เติมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรอง สารอินทรีย์ เหล็ก และสารควบคุมการเจริญเติบโตลงไป ตามลำดับ โดยเขย่าขวดให้น้ำยาผสมกันดีระหว่างแต่ละครั้งที่เติม

5.3 ละลายน้ำตาลใส่ลงไป แล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไปจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล.

5.4 เทสารละลายลงไปในบีกเกอร์ขนาด 2,000 มล. จากนั้นนำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 5.7 โดยใช้โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มอล หรือ กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล

5.5 ใส่วุ้นลงในอาหารแล้วนำไปต้มจนวุ้นละลาย

5.6 เตรียมใส่หลอดทดลองขนาด 25 X 150 มม. ปริมาตร 10 มล./หลอด แล้วปิดปากหลอดด้วยแผ่นพลาสติก และกระดาษลอกลาย แล้วรัดด้วยยางรัด

5.7 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ตาราง 7 ส่วนประกอบของสารละลายเข้มข้นแต่ละชนิด ในอาหารสูตร MS (1962)

ชนิดของสารละลาย	ปริมาณสารละลายเข้มข้นในอาหาร 1 ลิตร(มล.)
สารละลายธาตุอาหารหลักความเข้มข้น 10X	100
สารละลายธาตุอาหารรองความเข้มข้น 100X	10
สารละลายสารอินทรีย์ความเข้มข้น 100X	10
สารละลายเหล็กความเข้มข้น 100X	10
สารควบคุมการเจริญเติบโต	*
น้ำตาลซูโครส (น้ำหนัก/ปริมาตร)	30 ก/ล.
ผงวุ้น (น้ำหนัก/ปริมาตร)	8 ก/ล.

หมายเหตุ * ปริมาณที่ใช้ที่ขึ้นกับความเข้มข้นในแต่ละกรรมวิธีในการทดลอง

ตาราง 8 ปริมาตรสารละลายเข้มข้นของ BA ที่ใช้ในแต่ละกรรมวิธี

ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต	ปริมาตรสารละลายเข้มข้นในอาหาร 1 ลิตร (มล)
BA ความเข้มข้น 3.0 มก/ล.	30
BA ความเข้มข้น 5.0 มก/ล.	50
BA ความเข้มข้น 7.0 มก/ล.	70

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 9 ปริมาตรสารละลายเข้มข้นของ ABA ที่ใช้ในแต่ละกรรมวิธี

ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต	ปริมาตรสารละลายเข้มข้นในอาหาร 1 ลิตร (มล.)
ABA ความเข้มข้น 0.01 มก/ล.	0.1
ABA ความเข้มข้น 0.10 มก/ล.	1.0
ABA ความเข้มข้น 1.00 มก/ล.	10.0
ABA ความเข้มข้น 10.00 มก/ล.	100.0

ตาราง 10 ปริมาตรสารละลายเข้มข้นของ GA_3 ที่ใช้ในแต่ละกรรมวิธี

ชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต	ปริมาตรสารละลายเข้มข้นในอาหาร 1 ลิตร (มล.)
GA_3 ความเข้มข้น 0.01 มก/ล.	0.1
GA_3 ความเข้มข้น 0.10 มก/ล.	1.0
GA_3 ความเข้มข้น 1.00 มก/ล.	10.0
GA_3 ความเข้มข้น 10.00 มก/ล.	100.0

ตาราง 11 ปริมาตรสารละลายเข้มข้นของ spermidine ที่ใช้ในแต่ละกรรมวิธี

ชนิด และความเข้มข้น	ปริมาตรสารละลายเข้มข้นในอาหาร 1 ลิตร (มล.)
Spermidine ความเข้มข้น 0 มลม.	0
spermidine ความเข้มข้น 1 มลม.	1
spermidine ความเข้มข้น 2 มลม.	2
spermidine ความเข้มข้น 3 มลม.	3
spermidine ความเข้มข้น 4 มลม.	4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 12 ปริมาตรสารละลายเข้มข้นของ 5.– azacytidine ที่ใช้ในแต่ละกรรมวิธี

ชนิด และความเข้มข้น	ปริมาตรสารละลายเข้มข้น ในอาหาร 1 ลิตร (มล.)
5 – azacytidine ความเข้มข้น 0 มคม.	0
5 – azacytidine ความเข้มข้น 50 มคม.	50
5 – azacytidine ความเข้มข้น 100 มคม.	100
5 – azacytidine ความเข้มข้น 250 มคม.	250
5 – azacytidine ความเข้มข้น 500 มคม.	500

ตาราง 13 ปริมาตรสารละลายเข้มข้นของ โพแทสเซียมคลอเรท ที่ใช้ในแต่ละกรรมวิธี

ชนิด และความเข้มข้น	ปริมาตรสารละลายเข้มข้น ในอาหาร 1 ลิตร (มล.)
โพแทสเซียมคลอเรท ความเข้มข้น 0.0001 ก/ล.	0.001
โพแทสเซียมคลอเรท ความเข้มข้น 0.001 ก/ล.	0.010
โพแทสเซียมคลอเรท ความเข้มข้น 0.01 ก/ล.	0.100
โพแทสเซียมคลอเรท ความเข้มข้น 0.1 ก/ล.	1.000
โพแทสเซียมคลอเรท ความเข้มข้น 1.00 ก/ล.	10.000
โพแทสเซียมคลอเรท ความเข้มข้น 10 ก/ล.	100.000

6. การเตรียมอาหารสูตรพื้นฐาน VW (1949)

นำส่วนประกอบของอาหารพื้นฐานสูตร VW (1949) จากน้ำยาเข้มข้นที่เตรียมไว้ในข้อ 4 มาผสมให้เข้ากัน โดยใช้สารละลายเข้มข้นแต่ละชนิดดังแสดงที่ไว้ในตาราง 3 ขั้นตอนการเตรียม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สูตรอาหาร VW (1949) ทำเหมือนกับการเตรียมอาหารพื้นฐานสูตร MS ในข้อ 5 แต่ใช้ปริมาณของส่วนประกอบอาหารดังแสดงในตาราง 14

ตาราง 14 ส่วนประกอบของสารละลายเข้มข้นแต่ละชนิด ในอาหารสูตร VW (1949)

ชนิดของสารละลาย	ปริมาณสารละลายเข้มข้นในอาหาร 1 ลิตร (มล.)
สารละลายธาตุอาหารหลักความเข้มข้น 10X	100
สารละลายธาตุอาหารรองความเข้มข้น 100X	10
สารละลายสารอินทรีย์ความเข้มข้น 100X	10
สารละลายเหล็กความเข้มข้น 100X	10
สารควบคุมการเจริญเติบโต	*
น้ำตาลซูโครส (น้ำหนัก/ปริมาตร)	20 ก/ล.
ผงวุ้น (น้ำหนัก/ปริมาตร)	8 ก/ล.

หมายเหตุ * ปริมาณที่ใช้ขึ้นกับความเข้มข้นในแต่ละกรรมวิธีในการทดลอง

7. การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

ใช้วิธีการของ Johansen (1940)

8. วิธีการวิจัย

8.1 การทดลองที่ 1 การชักนำดอกในหลอดแก้ว

ชุดการทดลองที่ 1 เป็นการศึกษาการชักนำดอก จากกรรมวิธีต่าง ๆ เพื่อเตรียมไว้สำหรับศึกษาการพัฒนาดอกและสืดอกในหลอดแก้ว แบ่งการทดลองเป็น 7 การทดลองย่อยดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 1.1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดดอกในหลอดแก้ว

วิธีการทดลอง

ใช้อาหารต่างกัน 2 สูตร คือ MS และ VW (วิธีการเตรียมดูข้อ 5 และ 7 ตามลำดับ) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ BA ความเข้มข้น 0.02 มลม. โดยเตรียมใส่ในหลอดขนาด 25 X 150 มม. ปริมาตรหลอดละ 10 มล.

นำต้นหวายแคระลูกผสมที่มีใบ 4 ใบ ความสูงประมาณ 4 – 5 ซม. โดยผ่านวิธีการที่ได้อธิบายไว้ในข้อ 3 โดยใช้หน่อที่ 1 หรือ 2 ซึ่งมีอายุหลังการเลี้ยง 3 เดือนมาตัดรากออกเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) รวม 2 กรรมวิธี โดยแต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 หลอด

กรรมวิธีที่ 1 อาหารสูตร MS เติม BA 0.02 มลม.

กรรมวิธีที่ 2 อาหารสูตร VW เติม BA 0.02 มลม.

การบันทึกผล

1. จำนวนใบ/ต้น จำนวนหน่อใหม่/กอ จำนวนราก/กอ
2. จำนวนวันที่เริ่มออกดอก (สังเกตเห็นด้วยตาเปล่า) เปอร์เซ็นต์การออกดอก จำนวนช่อดอก/ต้น จำนวนดอก/ช่อ ความยาวช่อดอก และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางดอก

การทดลองที่ 1.2 การหาความเข้มข้นของ BA และระดับของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมสำหรับการออกดอกในหลอดแก้ว

วิธีการทดลอง

ใช้อาหารสูตรที่เหมาะสมจากผลการทดลองที่ 1.1 เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ BA และน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้นตามกรรมวิธีต่าง ๆ โดยเตรียมใส่ในหลอดขนาด 25 X 150 มม. ปริมาตรหลอดละ 10 มล.

วัสดุพืชทดลองเตรียมเหมือนการทดลองที่ 1.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) ทดสอบกับ 2 ปัจจัย คือ BA ความเข้มข้น 3 ระดับและน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 5 ระดับ รวม 15 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 หลอด

กรรมวิธีที่ 1 อาหารที่เติม BA 0.012 มลม. และ น้ำตาลซูโครส 30 ก/ล.

กรรมวิธีที่ 2 อาหารที่เติม BA 0.012 มลม. และ น้ำตาลซูโครส 45 ก/ล.

กรรมวิธีที่ 3 อาหารที่เติม BA 0.012 มลม. และ น้ำตาลซูโครส 60 ก/ล.

กรรมวิธีที่ 4 อาหารที่เติม BA 0.012 มลม. และ น้ำตาลซูโครส 75 ก/ล.

กรรมวิธีที่ 5 อาหารที่เติม BA 0.012 มลม. และ น้ำตาลซูโครส 90 ก/ล.

กรรมวิธีที่ 6 อาหารที่เติม BA 0.020 มลม. และ น้ำตาลซูโครส 30 ก/ล.

กรรมวิธีที่ 7 อาหารที่เติม BA 0.020 มลม. และ น้ำตาลซูโครส 45 ก/ล.

กรรมวิธีที่ 8 อาหารที่เติม BA 0.020 มลม. และ น้ำตาลซูโครส 60 ก/ล.

กรรมวิธีที่ 9 อาหารที่เติม BA 0.020 มลม. และ น้ำตาลซูโครส 75 ก/ล.

กรรมวิธีที่ 10 อาหารที่เติม BA 0.020 มลม. และ น้ำตาลซูโครส 90 ก/ล.

กรรมวิธีที่ 11 อาหารที่เติม BA 0.028 มลม. และ น้ำตาลซูโครส 30 ก/ล.

กรรมวิธีที่ 12 อาหารที่เติม BA 0.028 มลม. และ น้ำตาลซูโครส 45 ก/ล.

กรรมวิธีที่ 13 อาหารที่เติม BA 0.028 มลม. และ น้ำตาลซูโครส 60 ก/ล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 14 อาหารที่เติม BA 0.028 มลม. และ
น้ำตาลซูโครส 75 ก/ล.

กรรมวิธีที่ 15 อาหารที่เติม BA 0.028 มลม. และ
น้ำตาลซูโครส 90 ก/ล.

<u>การบันทึกผล</u>

1. จำนวนใบ/ต้น จำนวนหน่อใหม่/กอ จำนวนราก/กอ
2. จำนวนวันที่เริ่มออกดอก (สังเกตเห็นด้วยตาเปล่า) เปอร์เซ็นต์การออกดอก จำนวนช่อดอก/ต้น จำนวนดอก/ช่อ ความยาวช่อดอก และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางดอก

ทำการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาถึงการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ ต้นหวายแคระลูกผสมที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตทางลำต้น (vegetative stage) ไปเป็นระยะสืบพันธุ์ (reproductive stage)

การทดลองที่ 1.3 ผลของความยาววันและระดับของอุณหภูมิที่มีผลต่อการออกดอกในหลอดแก้ว

<u>วิธีการทดลอง</u>

ใช้อาหารสูตร MS (วิธีการเตรียมดูข้อ 5) ที่เติม BA 0.020 มลม. และน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมที่สุดคือ 60 ก/ล. จากผลการทดลองที่ 1.2 โดยเตรียมใส่ในหลอดขนาด 25 X 150 มม. ปริมาตรหลอดละ 10 มล. นำไปวางเลี้ยงในสภาพความยาววัน และอุณหภูมิ ตามกรรมวิธีต่าง ๆ

วัสดุพืชทดลองเตรียมเหมือนการทดลองที่ 1.1

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) รวม 6 กรรมวิธีโดยแต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 หลอด

กรรมวิธีที่ 1 วางเลี้ยงในสภาพช่วงแสง 24 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 13 °ซ

กรรมวิธีที่ 2 วางเลี้ยงในสภาพช่วงแสง 8 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 13 °ซ

กรรมวิธีที่ 3 วางเลี้ยงในสภาพช่วงแสง 24 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 20 °ซ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 4 วางเลี้ยงในสภาพช่วงแสง 8 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 20 °ซ

กรรมวิธีที่ 5 วางเลี้ยงในสภาพช่วงแสง 24 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 27 °ซ

กรรมวิธีที่ 6 วางเลี้ยงในสภาพช่วงแสง 8 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 27 °ซ

การบันทึกผล

1. จำนวนใบ/ต้น จำนวนหน่อใหม่/กอ จำนวนราก/กอ

2. จำนวนวันที่เริ่มออกดอก (สังเกตเห็นด้วยตาเปล่า) เปอร์เซ็นต์การออกดอก จำนวนช่อดอก/ต้น จำนวนดอก/ช่อ ความยาวช่อดอก และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางดอก

การทดลองที่ 1.4 ผลของ spermidine และ BA ต่อการออกดอกในหลอดแก้ว

วิธีการทดลอง

ใช้อาหารสูตร MS ที่เติมความเข้มข้นของน้ำตาล 60 ก/ล. และเติม sp (spermidine) และ BA ความเข้มข้นตามกรรมวิธีต่าง ๆ โดยเตรียมใส่ในหลอด 25 X 150 มม. ปริมาตรหลอดละ 10 มล.

วัสดุพืชทดลองเตรียมเหมือนการทดลองที่ 1.1

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) ทดสอบกับ 2 ปัจจัย คือ sp 4 ระดับ และ BA 3 ระดับ รวม 15 กรรมวิธี โดยแต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 หลอดการทดลอง

กรรมวิธีที่ 1 อาหารเติม sp 0 มลม. และ BA 0.012 มลม.

กรรมวิธีที่ 2 อาหารเติม sp 0 มลม. และ BA 0.020 มลม.

กรรมวิธีที่ 3 อาหารเติม sp 0 มลม. และ BA 0.028 มลม.

กรรมวิธีที่ 4 อาหารเติม sp 1 มลม. และ BA 0.012 มลม.

กรรมวิธีที่ 5 อาหารเติม sp 1 มลม. และ BA 0.020 มลม.

กรรมวิธีที่ 6 อาหารเติม sp 1 มลม. และ BA 0.028 มลม.

กรรมวิธีที่ 7 อาหารเติม sp 2 มลม. และ BA 0.012 มลม.

กรรมวิธีที่ 8 อาหารเติม sp 2 มลม. และ BA 0.020 มลม.

กรรมวิธีที่ 9 อาหารเติม sp 2 มลม. และ BA 0.028 มลม.

กรรมวิธีที่ 10 อาหารเติม sp 3 มลม. และ BA 0.012 มลม.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 11 อาหารเติม sp 3 มลม. และ BA 0.020 มลม.
กรรมวิธีที่ 12 อาหารเติม sp 3 มลม. และ BA 0.028 มลม.
กรรมวิธีที่ 13 อาหารเติม sp 4 มลม. และ BA 0.012 มลม.
กรรมวิธีที่ 14 อาหารเติม sp 4 มลม. และ BA 0.020 มลม.
กรรมวิธีที่ 15 อาหารเติม sp 4 มลม. และ BA 0.028 มลม.

<u>การบันทึกผล</u>

1. จำนวนใบ/ต้น จำนวนหน่อใหม่/กอ จำนวนราก/กอ
2. จำนวนวันที่เริ่มออกดอก (สังเกตเห็นด้วยตาเปล่า) เปอร์เซ็นต์การออกดอก จำนวนช่อดอก/ต้น จำนวนดอก/ช่อ ความยาวช่อดอก และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางดอก

การทดลองที่ 1.5 ผลของ ABA ต่อการออกดอกในหลอดแก้ว

<u>วิธีการทดลอง</u>

ใช้อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ ABA ความเข้มข้นตามกรรมวิธีต่าง ๆ โดยเตรียมใส่ในหลอดขนาด 25 X 150 มม. หลอดละ 10 มล.

นำต้นหวายแคระลูกผสมที่มีใบ 4 ใบ และความสูงประมาณ 4 – 5 ซม. ซึ่งผ่านวิธีการที่ได้อธิบายไว้ในข้อ 3 มาตัดรากออกใช้ในกรรมวิธีต่าง ๆ เป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA 0.020 มลม. และน้ำตาลซูโครส 60 ก/ล.

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) รวม 4 กรรมวิธี โดยแต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 หลอด

กรรมวิธีที่ 1 อาหารเติม ABA 0.01 มก/ล.
กรรมวิธีที่ 2 อาหารเติม ABA 0.10 มก/ล.
กรรมวิธีที่ 3 อาหารเติม ABA 1.00 มก/ล.
กรรมวิธีที่ 4 อาหารเติม ABA 10.00 มก/ล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การบันทึกผล

1. จำนวนใบ/ต้น จำนวนหน่อใหม่/กอ จำนวนราก/กอ
2. จำนวนวันที่เริ่มออกดอก (สังเกตเห็นด้วยตาเปล่า) เปอร์เซ็นต์การออกดอก จำนวนช่อดอก/ต้น จำนวนดอก/ช่อ ความยาวช่อดอก และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางดอก

การทดลองที่ 1.6 ผลของโพแทสเซียมคลอเรท ($KClO_3$) ต่อการออกดอกในหลอดแก้ว

วิธีการทดลอง

ใช้อาหารเหลวสูตร MS วิธี paper. bridge นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วจึงนำมาเติมโพแทสเซียมคลอเรท ที่ผ่านการกรองด้วยเมมเบรนขนาดรู 0.22 ไมโครเมตร ความเข้มข้นของโพแทสเซียมคลอเรทใช้ตามกรรมวิธีต่าง ๆ

นำต้นหวายแคระลูกผสมที่มีใบ 4 ใบ และความสูงประมาณ 4 – 5 ซม. ซึ่งผ่านวิธีการที่ได้อธิบายไว้ในข้อ 3 มาตัดรากออกโดยเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA 0.020 มลม. และน้ำตาลซูโครส 60 ก/ล.

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) รวม 6 กรรมวิธี โดยแต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 หลอด

กรรมวิธีที่ 1 อาหารที่เติมโพแทสเซียมคลอเรท 0.0001 ก/ล.
กรรมวิธีที่ 2 อาหารที่เติมโพแทสเซียมคลอเรท 0.001 ก/ล.
กรรมวิธีที่ 3 อาหารที่เติมโพแทสเซียมคลอเรท 0.01 ก/ล.
กรรมวิธีที่ 4 อาหารที่เติมโพแทสเซียมคลอเรท 0.1 ก/ล.
กรรมวิธีที่ 5 อาหารที่เติมโพแทสเซียมคลอเรท 1 ก/ล.
กรรมวิธีที่ 6 อาหารที่เติมโพแทสเซียมคลอเรท 10 ก/ล.

การบันทึกผล

1. จำนวนใบ/ต้น จำนวนหน่อใหม่/กอ จำนวนราก/กอ
2. จำนวนวันที่เริ่มออกดอก (สังเกตเห็นด้วยตาเปล่า) เปอร์เซ็นต์การออกดอก จำนวนช่อดอก/ต้น จำนวนดอก/ช่อ ความยาวช่อดอก และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางดอก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 1.7 ผลของ 5-azacytidine และ BA ต่อการออกดอกในหลอดแก้ว

วิธีการทดลอง

ใช้อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 60 ก/ล. และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ aza (5-azacytidine) และ BA ความเข้มข้นตามกรรมวิธีต่าง ๆ โดยเตรียมใส่ในหลอดขนาด 25 X 150 มม. หลอดละ 10 มล.

วัสดุพืชทดลองเตรียมเหมือนการทดลองที่ 1.1

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยในร่วมสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) ทดสอบ 2 ปัจจัย คือ aza ความเข้มข้น 5 ระดับ และ BA ความเข้มข้น 4 ระดับ รวม 20 กรรมวิธี โดยแต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 หลอด

กรรมวิธีที่ 1 อาหารเติม aza 0 มคม. และ BA 0 มลม.
กรรมวิธีที่ 2 อาหารเติม aza 0 มคม. และ BA 0.012 มลม.
กรรมวิธีที่ 3 อาหารเติม aza 0 มคม. และ BA 0.020 มลม.
กรรมวิธีที่ 4 อาหารเติม aza 0 มคม. และ BA 0.028 มลม.
กรรมวิธีที่ 5 อาหารเติม aza 50 มคม. และ BA 0 มลม.
กรรมวิธีที่ 6 อาหารเติม aza 50 มคม. และ BA 0.012 มลม.
กรรมวิธีที่ 7 อาหารเติม aza 50 มคม. และ BA 0.020 มลม.
กรรมวิธีที่ 8 อาหารเติม aza 50 มคม. และ BA 0.028 มลม.
กรรมวิธีที่ 9 อาหารเติม aza 100 มคม. และ BA 0 มลม.
กรรมวิธีที่ 10 อาหารเติม aza 100 มคม. และ BA 0.012 มลม.
กรรมวิธีที่ 11 อาหารเติม aza 100 มคม. และ BA 0.020 มลม.
กรรมวิธีที่ 12 อาหารเติม aza 100 มคม. และ BA 0.028 มลม.
กรรมวิธีที่ 13 อาหารเติม aza 250 มคม. และ BA 0 มลม.
กรรมวิธีที่ 14 อาหารเติม aza 250 มคม. และ BA 0.012 มลม.
กรรมวิธีที่ 15 อาหารเติม aza 250 มคม. และ BA 0.020 มลม.
กรรมวิธีที่ 16 อาหารเติม aza 250 มคม. และ BA 0.028 มลม.
กรรมวิธีที่ 17 อาหารเติม aza 500 มคม. และ BA 0 มลม.
กรรมวิธีที่ 18 อาหารเติม aza 500 มคม. และ BA 0.012 มลม.
กรรมวิธีที่ 19 อาหารเติม aza 500 มคม. และ BA 0.020 มลม.
กรรมวิธีที่ 20 อาหารเติม aza 500 มคม. และ BA 0.028 มลม.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การบันทึกผล

1. จำนวนใบ/ต้น จำนวนหน่อใหม่/กอ จำนวนราก/กอ
2. จำนวนวันที่เริ่มออกดอก (สังเกตเห็นด้วยตาเปล่า) เปอร์เซ็นต์การออกดอก จำนวนช่อดอก/ต้น จำนวนดอก/ช่อ ความยาวช่อดอก และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางดอก

8.2 การทดลองที่ 2 การพัฒนาดอกและสีดอกในหลอดแก้ว

แบ่งการทดลองออกเป็น 4 การทดลองย่อยดังนี้

การทดลองที่ 2.1 การหาสูตรอาหารและระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมต่อการพัฒนาดอกในหลอดแก้ว

วิธีการทดลอง

ใช้อาหารสูตรต่างกัน 2 สูตรคือ MS และ VW ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นตามกรรมวิธีต่าง ๆ โดยเตรียมใส่ในหลอดขนาด 25 X 150 มม. หลอดละ 10 มล.

นำต้นหวายแคระลูกผสมที่มีใบ 4 ใบ ความสูงประมาณ 4 – 5 ซม. และมีตาดอกอยู่แล้วมาทำการทดลอง วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) รวม 8 กรรมวิธี โดยแต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ ซ้ำละ 1 หลอด

กรรมวิธีที่ 1 อาหารสูตร VW และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 30 ก/ล.
กรรมวิธีที่ 2 อาหารสูตร VW และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 60 ก/ล.
กรรมวิธีที่ 3 อาหารสูตร VW และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 90 ก/ล.
กรรมวิธีที่ 4 อาหารสูตร VW และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 120 ก/ล.
กรรมวิธีที่ 5 อาหารสูตร MS และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 30 ก/ล.
กรรมวิธีที่ 6 อาหารสูตร MS และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 60 ก/ล.
กรรมวิธีที่ 7 อาหารสูตร MS และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 90 ก/ล.
กรรมวิธีที่ 8 อาหารสูตร MS และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 120 ก/ล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การบันทึกผล ทำการบันทึกผลทุกสัปดาห์

1. เส้นผ่าศูนย์กลางของดอก
2. องค์ประกอบของดอก
3. การบานของดอก โดยให้เป็นคะแนน (สังเกตเห็นด้วยตาเปล่า) มีระดับคะแนนดังนี้

0	ไม่บานต่อ
1	บานเป็นบางส่วนขององค์ประกอบดอก
2	บานเป็นส่วนใหญ่ขององค์ประกอบดอก
3	บานทั้งหมด

4. การพัฒนาสีของดอก โดยให้เป็นคะแนน (สังเกตเห็นด้วยตาเปล่า) มีระดับคะแนนดังนี้

0	ไม่เห็นสี
1	เห็นสี

5.ระยะเวลาที่ดอกฝ่อ

การทดลองที่ 2.2 ผลของจิบเบอเรลลิคเอซิด (GA_3) ต่อการพัฒนาดอกในหลอดแก้ว

วิธีการทดลอง

ใช้อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ จิบเบอเรลลิคเอซิด (GA_3) ความเข้มข้นตามกรรมวิธีต่าง ๆ โดยเตรียมใส่ในหลอดขนาด 25 X 150 มม. หลอดละ 10 มล.

นำต้นหวายแคระลูกผสมที่มีใบ 4 ใบ ความสูงประมาณ 4 – 5 ซม. และมีตาดอกอยู่แล้วมาใช้ในการทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) รวม 4 กรรมวิธี โดยแต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ ซ้ำละ 1 หลอด

กรรมวิธีที่ 1 อาหารเติม จิบเบอเรลลิคเอซิด (GA_3) 0.01 มก/ล.
กรรมวิธีที่ 2 อาหารเติม จิบเบอเรลลิคเอซิด (GA_3) 0.10 มก/ล.
กรรมวิธีที่ 3 อาหารเติม จิบเบอเรลลิคเอซิด (GA_3) 1.00 มก/ล.
กรรมวิธีที่ 4 อาหารเติม จิบเบอเรลลิคเอซิด (GA_3) 10.00 มก/ล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

<u>การบันทึกผล</u> ทำการบันทึกผลทุกสัปดาห์

1.เส้นผ่าศูนย์กลางของดอก

2.องค์ประกอบของดอก

3.การบานของดอก โดยให้เป็นคะแนน (สังเกตเห็นด้วยตาเปล่า) มีระดับคะแนนดังนี้

0	ไม่บานต่อ
1	บานเป็นบางส่วนขององค์ประกอบดอก
2	บานเป็นส่วนใหญ่ขององค์ประกอบดอก
3	บานทั้งหมด

4.การพัฒนาสีของดอก โดยให้เป็นคะแนน (สังเกตเห็นด้วยตาเปล่า) มีระดับคะแนนดังนี้

0	ไม่เห็นสี
1	เห็นสี

5.ระยะเวลาที่ดอกฝ่อ

การทดลองที่ 2.3 ผลของแหล่งของแสงและความเข้มแสงต่อการพัฒนาของดอกในหลอดแก้ว

<u>วิธีการทดลอง</u>

ใช้อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 60 ก/ล. โดยเตรียมใส่ในหลอดขนาด 25 X 150 มม. ปริมาตรหลอดละ 10 มล. นำมาวางภายใต้แหล่งของแสง 2 แบบ คือ หลอดฟลูออเรสเซนส์ และหลอดอินแคนเดสเซนส์ โดยให้ความเข้มแสง 4 ระดับ

นำต้นหวายแคระลูกผสมที่มีใบ 4 ใบ ความสูงประมาณ 4 – 5 ซม. และมีตาดอกอยู่แล้วมาทำการทดลอง วางแผนการทดลองปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) รวม 8 กรรมวิธี โดยแต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ ซ้ำละ 1 หลอด

กรรมวิธีที่ 1 วางเลี้ยงใต้หลอดฟลูออเรสเซนส์ ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์

กรรมวิธีที่ 2 วางเลี้ยงใต้หลอดฟลูออเรสเซนส์ ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์

กรรมวิธีที่ 3 วางเลี้ยงใต้หลอดฟลูออเรสเซนส์ ความเข้มแสง 6,000 ลักซ์

กรรมวิธีที่ 4 วางเลี้ยงใต้หลอดฟลูออเรสเซนส์ ความเข้มแสง 8,000 ลักซ์

กรรมวิธีที่ 5 วางเลี้ยงใต้หลอดอินแคนเดสเซนส์ ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 6 วางเลี้ยงใต้หลอดอินแคนเดสเซนส์ ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์
กรรมวิธีที่ 7 วางเลี้ยงใต้หลอดอินแคนเดสเซนส์ ความเข้มแสง 6,000 ลักซ์
กรรมวิธีที่ 8 วางเลี้ยงใต้หลอดอินแคนเดสเซนส์ ความเข้มแสง 8,000 ลักซ์

<u>การบันทึกผล</u> ทำการบันทึกผลทุกสัปดาห์

1.เส้นผ่าศูนย์กลางของดอก

2.องค์ประกอบของดอก

3.การบานของดอก โดยให้เป็นคะแนน (สังเกตเห็นด้วยตาเปล่า) มีระดับคะแนนดังนี้

0 ไม่บานต่อ
1 บานเป็นบางส่วนขององค์ประกอบดอก
2 บานเป็นส่วนใหญ่ขององค์ประกอบดอก
3 บานทั้งหมด

4.การพัฒนาสีของดอก โดยให้เป็นคะแนน (สังเกตเห็นด้วยตาเปล่า) มีระดับคะแนนดังนี้

0 ไม่เห็นสี
1 เห็นสี

5.ระยะเวลาที่ดอกฝ่อ

การทดลองที่ 2.4 การหาระดับฟอสฟอรัสทั้งหมด (Total phosphorus) และระดับโปแตสเซียมทั้งหมด (Total potassium) ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาดอกและสีดอกในหลอดแก้ว

<u>วิธีการทดลอง</u>

ใช้อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 60 ก/ล. โดยปรับความเข้มข้นของระดับฟอสฟอรัสและความเข้มข้นของระดับโปแตสเซียมทั้งหมด โดยการปรับให้ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม มีความเข้มข้น 1X, 2X และ 3X จากสูตรมาตรฐานตามกรรมวิธีต่าง ๆ ใส่ในหลอดขนาด 25 X 150 มม. หลอดละ 10 มล.

นำต้นหวายแคระลูกผสมที่มีใบ 4 ใบ ความสูงประมาณ 4 – 5 ซม. และมีตาดอกอยู่แล้วมาทำการทดลอง วางแผนการทดลองปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) รวม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

9 กรรมวิธี โดยแต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ ซ้ำละ 1 หลอด มีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ความเข้มข้นของระดับฟอสฟอรัสทั้งหมดเป็น 1 เท่าและความเข้มข้นของโพแตสเซียมทั้งหมดเป็น 1 เท่าของสูตรมาตรฐาน

กรรมวิธีที่ 2 ความเข้มข้นของระดับฟอสฟอรัสทั้งหมดเป็น 1 เท่าและความเข้มข้นของโพแตสเซียมทั้งหมดเป็น 2 เท่าของสูตรมาตรฐาน

กรรมวิธีที่ 3 ความเข้มข้นของระดับฟอสฟอรัสทั้งหมดเป็น 1 เท่าและความเข้มข้นของโพแตสเซียมทั้งหมดเป็น 3 เท่าของสูตรมาตรฐาน

กรรมวิธีที่ 4 ความเข้มข้นของระดับฟอสฟอรัสทั้งหมดเป็น 2 เท่าและความเข้มข้นของโพแตสเซียมทั้งหมดเป็น 1 เท่าของสูตรมาตรฐาน

กรรมวิธีที่ 5 ความเข้มข้นของระดับฟอสฟอรัสทั้งหมดเป็น 2 เท่าและความเข้มข้นของโพแตสเซียมทั้งหมดเป็น 2 เท่าของสูตรมาตรฐาน

กรรมวิธีที่ 6 ความเข้มข้นของระดับฟอสฟอรัสทั้งหมดเป็น 2 เท่าและความเข้มข้นของโพแตสเซียมทั้งหมดเป็น 3 เท่าของสูตรมาตรฐาน

กรรมวิธีที่ 7 ความเข้มข้นของระดับฟอสฟอรัสทั้งหมดเป็น 3 เท่าและความเข้มข้นของโพแตสเซียมทั้งหมดเป็น 1 เท่าของสูตรมาตรฐาน

กรรมวิธีที่ 8 ความเข้มข้นของระดับฟอสฟอรัสทั้งหมดเป็น 3 เท่าและความเข้มข้นของโพแตสเซียมทั้งหมดเป็น 2 เท่าของสูตรมาตรฐาน

กรรมวิธีที่ 9 ความเข้มข้นของระดับฟอสฟอรัสทั้งหมดเป็น 3 เท่าและความเข้มข้นของโพแตสเซียมทั้งหมดเป็น 3 เท่าของสูตรมาตรฐาน

<u>การบันทึกผล</u> ทำการบันทึกผลทุกสัปดาห์

1.เส้นผ่าศูนย์กลางของดอก

2.องค์ประกอบของดอก

3.การบานของดอก โดยให้เป็นคะแนน (สังเกตเห็นด้วยตาเปล่า) มีระดับคะแนนดังนี้

0	ไม่บานต่อ
1	บานเป็นบางส่วนขององค์ประกอบดอก
2	บานเป็นส่วนใหญ่ขององค์ประกอบดอก
3	บานทั้งหมด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4.การพัฒนาสีของดอก โดยให้เป็นคะแนน (สังเกตเห็นด้วยตาเปล่า) มีระดับคะแนนดังนี้

0 ไม่เห็นสี

1 เห็นสี

5.ระยะเวลาที่ดอกฝ่อ

สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย และรวบรวมข้อมูล

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และห้องปฏิบัติการเนื้อเยื่อวิทยา ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย

เดือนเมษายน 2543 - เมษายน 2546

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 1 (1) ดอกของหวายแคระลูกผสม *Dendrobium* Thai Siri X *Dendrobium* Thai Jewel

(2) ดอกของหวายแคระลูกผสม *Dendrobium* Thai Siri X *Dendrobium* Thai Compactum

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 2 ลักษณะการเกิดของช่อดอกหวายแคระลูกผสมในสภาพปลูกเลี้ยงปกติ

(1) *Dendrobium* Thai Siri X *Dendrobium* Thai Jewel

(2)*Dendrobium* Thai Siri X *Dendrobium* Thai Compactum

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved