บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา มีดังนี้

1. **วัสดุและอุปกรณ์**

1.1 กิ่งพันธุ์กุหลาบมอญ ใช้กิ่งแก่ขนาดยาวประมาณ 30 เซนติเมตร
1.2 เครื่องชั่งชนิดละเอียด (analytical balance)
1.3 เครื่องชั่งไฟฟ้า (electrical balance)
1.4 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)
1.5 เครื่องเขย่า (shaker)
1.6 เครื่องหมุน (rotator)
1.7 เครื่องฝานเนื้อเยื่อ (microtome)
1.8 หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
1.9 เตาไฟฟ้า (hot plate)
1.10 ตู้กรองอากาศ (laminar air flow)
1.11 ตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่สามารถควบคุมอุณหภูมิและแสง
1.12 ชั้นสำหรับวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งติดหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ชั้นละ 3 หลอด โดยมีระยะห่างจากขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ฟุต
1.13 หลอดเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 1 x 6 นิ้ว
1.14 เครื่องแก้วอื่น เช่น ปิเปต (pipette), กระบอกตวง (cylinder), บิกเกอร์ (beaker), ขวดรูปชมพู่ (flask), กรวย (funnel), ขวดใส่สารละลายเข้มข้นและจานเลี้ยงเชื้อ (petridish)
1.15 วัสดุอื่น ๆ เช่น ด้ามมีดและใบมีดผ่าตัด, ตะเกียงแอลกอฮอล์, กระดาษกรอง, ช้อนตักสาร, กระดาษอลูมินัม (aluminium foil), ยางรัดของ ฯลฯ
1.16 น้ำกลั่นซึ่งกลั่นจากเครื่องแก้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. สารเคมี

สารเคมีที่ใช้มีดังนี้คือ

2.1 สารที่ใช้ทำความสะอาดฆ่าเชื้อ

2.1.1 Ethanol ซึ่งมีความเข้มข้นร้อยละ 95

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

2.2 สารควบคุมการเจริญของพืช

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

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

2.2.3 Gibberellic acid (GA_3) ของบริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.

2.2.4 Indole butyric acid (IBA) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt West Germany

2.3 สารที่ใช้เตรียมอาหาร

2.3.1 ผงวุ้น (agar) ตราเฮลิคอปเตอร์

2.3.2 น้ำกลั่นซึ่งกลั่นโดยใช้เครื่องแก้ว

2.3.3 ธาตุอาหารหลักต่าง ๆ ตามสูตร MS (1962)

2.3.4 ธาตุอาหารรองต่าง ๆ ตามสูตร MS (1962)

2.3.5 วิตามินต่าง ๆ ตามสูตร MS (1962)

2.3.6 Ferrous Sulfate ของบริษัท J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg. N.J., U.S.A.

2.3.7 Ethylene diamine tetraacetic acid diNa-salt dihydrate ของบริษัท Koch-Light Laboratories Ltd., England

2.4 สารที่ใช้ในการศึกษาทางเซลวิทยา

2.4.1 Xylon ของบริษัท Riedel-de Haen AG Seelze-Hannover , West Germany

2.4.2 พาราฟิน ของบริษัท BDH Chemicals Ltd., Poole, England

2.4.3 สี salfranin ของบริษัท BDH Chemicals Ltd., Poole, England

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

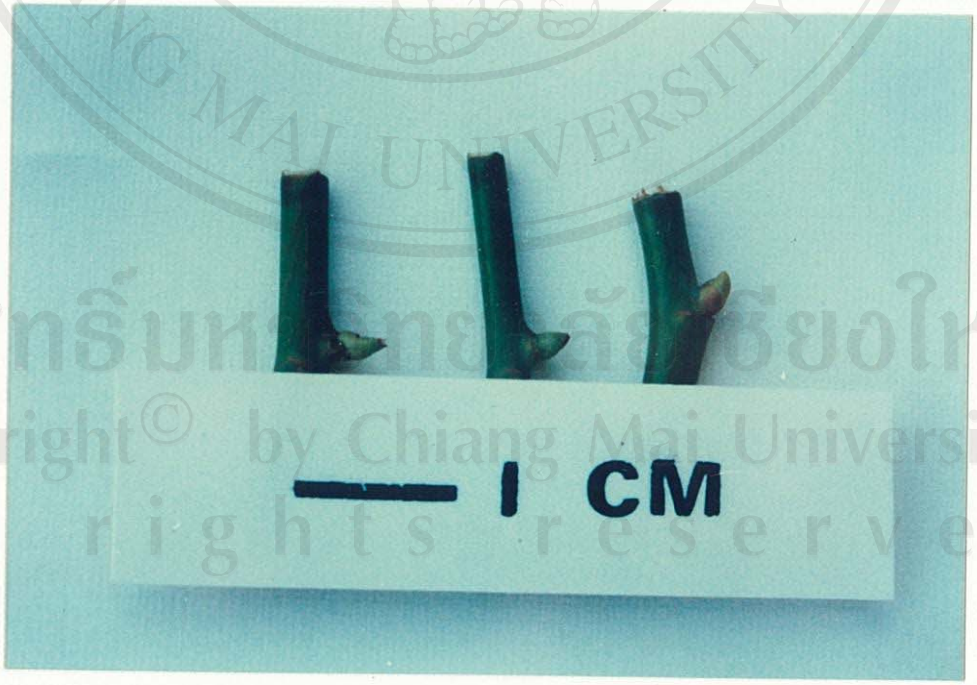
3. การเตรียมกิ่งพันธุ์

การศึกษาครั้งนี้ใช้กิ่งพันธุ์กุหลาบมอญจากต้นซึ่งปลูกเลี้ยงอยู่ที่พระตำหนักภูพิงค์ราชนิเวศน์ จังหวัดเชียงใหม่ (ภาพที่ 2 หน้า 23) การคัดเลือกตาข้างจะเลือกจากกิ่งที่ดอกโรยแล้วซึ่งอยู่ถัดลงมาจากโคนดอกในช่วงความยาวประมาณ 30 เซนติเมตร (ภาพที่ 3 หน้า 24) ตาเหล่านี้จะบวมเต่งออกมาอย่างเห็นได้ชัด นำกิ่งพันธุ์ที่คัดเลือก แล้วมาปลิดใบออกให้หมด ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำ ตัดเป็นท่อนสั้น ๆ ขนาด 2 เซนติเมตร โดยให้แต่ละท่อนมีตาติดอยู่ 1 ตา (ภาพที่ 4 หน้า 24) ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวของ กิ่งพันธุ์โดยการนำมาแช่ย่าในสารละลายคลอร็อกซ์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 ซึ่งเตรียม โดยใช้สารคลอร็อกซ์ 10 มิลลิลิตร ผสมน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร แช่ย่าท่อนกิ่งพันธุ์ดังกล่าวในสารละลายคลอร็อกซ์เป็นเวลานาน 15 นาที (ภาพที่ 5 หน้า 25) หลังจากนั้นจึงนำ มาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง โดยทำในตู้ปลอดเชื้อ

ภาพที่ 2 แปลงต้นพันธุ์กุหลาบมอญ ที่พระตำหนักภูพิงค์ราชนิเวศน์

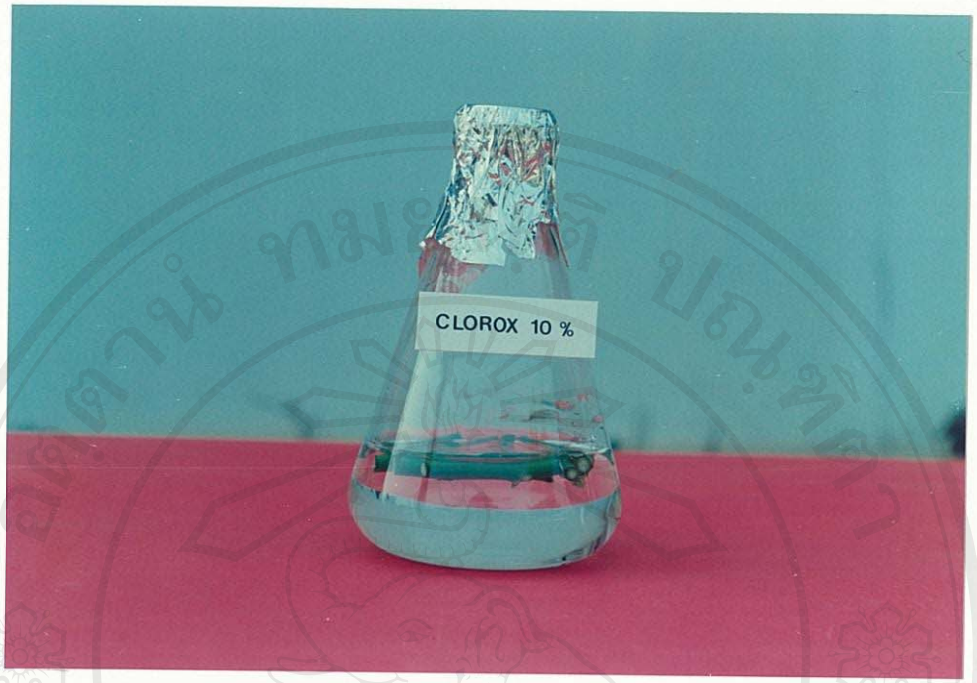
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 3 ตำแหน่งตากุหลาบที่นำมาเลี้ยง



ภาพที่ 4 ท่อนกิ่งพันธุ์ที่มีตาติดอยู่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 5 การฆ่าเชื้อกึ่งพันธุ์ในน้ำยาคลอร็อกซ์

4. การเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution)

อาหารในแต่ละสูตรตามการทดลองจะมีองค์ประกอบหลักใหญ่ ๆ คล้ายคลึงกัน วิธีที่สะดวกในการเตรียมอาหารคือ การเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้นแยกเป็นหมวดหมู่ ดังนี้

4.1 การเตรียมธาตุอาหารหลัก

เตรียมธาตุอาหารหลักแต่ละตัวในสูตร MS (1962) โดยเตรียมแยกเป็นขวดละชนิด ให้มีความเข้มข้นชนิดละ 1 โมลาร์ (M) ปริมาตรชนิดละ 200 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำหนักของสารดังต่อไปนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 ชนิดและปริมาณของสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร MS (1962)

ชนิดของสาร	สูตร MS (1962) (มิลลิกรัม/ลิตร)	ปริมาณสารในน้ำปริมาตรสุดท้าย 200 มิลลิลิตร (กรัม)
NH_4NO_3	1650	16.008
KNO_3	1900	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**

เตรียมโดยใช้สูตร MS (1962) โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน ความเข้มข้นมากกว่าที่ใช้จริง 100 X โดยชั่งสารแต่ละชนิดตามที่กำหนด ละลายน้ำรวมกันให้มีปริมาตรสุดท้าย 1000 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 ชนิดและปริมาณของสารในสารละลายเข้มข้นธาตุอาหารรองรวมสูตร MS (1962) ความเข้มข้น 100 X

ชนิดของสาร	สูตร MS (1962) (มิลลิกรัม/ลิตร)	ปริมาณสารในน้ำปริมาตรสุดท้าย 1000 มิลลิลิตร (มิลลิกรัม)
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	2.5
KI	0.83	83
$ZnSO_4.7H_2O$	8.60	860
$MnSO_4.4H_2O$	22.30	2230
H_3BO_3	6.2	620
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	25
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	2.5

4.3 **การเตรียมวิตามิน**

เนื่องจากในบางการทดลองอาหารที่ใช้เลี้ยงมีส่วนผสมของวิตามินรวมตามสูตร MS (1962) ดัดแปลงรวมอยู่ด้วย การเตรียมจะทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมกันไว้ในขวด โดยมีความเข้มข้นมากกว่าที่ใช้จริง 100 X ซึ่งเตรียมได้ ชั่งสารแต่ละชนิดตามที่กำหนดละลายน้ำรวมกันให้มีปริมาตรสุดท้าย 1000 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3 ชนิดและปริมาณของสารในสารละลายเข้มข้นวิตามินรวมตามสูตร MS (1962) ดัดแปลง ความเข้มข้น 100 X

ชนิดของสาร	สูตร MS (1962) (มิลลิกรัม/ลิตร)	ปริมาณสารในน้ำปริมาตรสุดท้าย 1000 มิลลิลิตร (กรัม)
glycine	2	0.2
myo-inositol	100	10.0
thiamin.HCl	0.1	0.025
pyridoxine	0.5	0.025
nicotinic acid	0.5	0.025

4.4 การเตรียมสารละลายเหล็กในรูป FeEDTA

เหล็กตามสูตร MS (1962) ประกอบด้วย $Na_2EDTA.2H_2O$ และ $FeSO_4.7H_2O$ การเตรียมจะทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมกันไว้ในขวดโดยมีความเข้มข้นมากกว่าที่ใช้จริง 100 X ซึ่งเตรียมได้ชั่งสารแต่ละชนิดตามที่กำหนด ละลายสารแต่ละส่วนในน้ำปริมาตรสุดท้าย 500 มิลลิลิตร แล้วจึงนำมาผสมรวมกันเก็บไว้ในที่มืดโดยหุ้มขวดด้วยกระดาษอลูมินัมให้มิดชิดเพื่อป้องกันแสง

ตารางที่ 4 ชนิดและปริมาณของสารในสารละลายเข้มข้นเหล็ก 100 X

ชนิดของสาร	สูตร MS (1962) (มิลลิกรัม/ลิตร)	ปริมาณสารในน้ำปริมาตรสุดท้าย 1000 มิลลิลิตร (กรัม)
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.3	3.73
$FeSO_4.7H_2O$	27.8	2.78

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.5 การเตรียมฮอร์โมน

เตรียมสารฮอร์โมนที่ใช้ในการทดลองคือ BAP, GA_3, NAA และ IBA โดยแยกเตรียมแต่ละชนิดดังนี้

4.5.1 การเตรียม BAP

ชั่ง BAP 20 มิลลิกรัม ละลายด้วยสารละลาย 1 N NaOH จำนวนเล็กน้อยก่อนพอให้ละลายแล้วจึงปรับปริมาตรให้เป็น 20 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น สำหรับอัตราส่วนความเข้มข้นที่จะใช้จริงจะแตกต่างกันออกไปตามการทดลองที่กำหนด

4.5.2 การเตรียม GA_3

ขั้นตอนการทำเป็นสารละลายเช่นเดียวกับการเตรียม BAP แต่ใช้ Ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 95 ละลายแทน NaOH และจะทำเป็นสารละลายเข้มข้นไว้ในปริมาณ 1 มิลลิกรัม/10 มิลลิลิตร อัตราส่วนความเข้มข้นที่ใช้จริงดูรายละเอียดตามการทดลองแต่ละวิธีที่กำหนด

4.5.3 การเตรียม NAA

เตรียมเช่นเดียวกับสารละลาย GA_3 แต่ใช้ NAA 1 มิลลิกรัม/สารละลาย 100 มิลลิลิตร สำหรับอัตราส่วนความเข้มข้นที่ใช้จริงดูรายละเอียดตามการทดลองแต่ละวิธีที่กำหนด

4.5.4 การเตรียม IBA

ขั้นตอนการทำเป็นสารละลายเช่นเดียวกับการเตรียม NAA แต่จะทำเป็นสารละลายเข้มข้นไว้ในปริมาณ 5 มิลลิกรัม/สารละลาย 100 มิลลิลิตร อัตราส่วนความเข้มข้นที่ใช้จริงดูรายละเอียดตามการทดลองแต่ละวิธีที่กำหนด

สารละลายทุกชนิดที่เตรียมเสร็จแล้วปิดฝาให้แน่น เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การเตรียมอาหารสูตร KI

อาหารสูตร KI (สูตรจากไอร์แลนด์ เอกสารไม่ตีพิมพ์เผยแพร่) ซึ่งเป็นสูตรอาหารหลักที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ มีส่วนประกอบของธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง และเหล็กตามสูตร MS(1962) + ฮอร์โมน BAP, GA_3 และ NAA การเตรียมอาหารสูตรนี้จะเตรียมจากสารละลายเข้มข้นที่มีอยู่ (ดูรายละเอียดข้อ 4) โดยในอาหารสูตร KI ปริมาณ 1 ลิตร จะมีส่วนประกอบของสารละลายเข้มข้นต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบของสารละลายเข้มข้นแต่ละชนิดในอาหารสูตร KI

ชนิดของสารละลาย	ปริมาณสารละลายเข้มข้นในอาหาร 1 ลิตร (มิลลิลิตร)
ธาตุอาหารหลัก	
ความเข้มข้นชนิดละ 1 โมลาร์	
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
ธาตุอาหารรองและเหล็ก	
ความเข้มข้น 100 X	
ธาตุอาหารรองรวม	10
เหล็ก	10
ฮอร์โมน	
BAP (20 มิลลิกรัม/20 มิลลิลิตร)	1
GA_3 (1 มิลลิกรัม/10 มิลลิลิตร)	0.1
NAA (1 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร)	0.01

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ทำการเตรียมอาหารที่ใช้เลี้ยงโดยใส่น้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ลงไปในขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมสารละลายแต่ละชนิดของธาตุอาหารหลักลงไปคนให้เข้ากันดี แล้วจึงเติมธาตุอาหารรอง วิตามิน เหล็ก และฮอร์โมน โดยทุกครั้งที่จะเติมสารละลายชนิดใหม่ลงไปจะคนสารละลายที่มีอยู่เดิมให้เข้ากันดีเสียก่อนเพื่อป้องกันการตกตะกอน เมื่อผสมสารชนิดต่าง ๆ ครบตามปริมาณที่กำหนดแล้ว เติมน้ำกลั่นลงไปในสารละลายจนมีปริมาตรสุดท้าย 1000 มิลลิลิตร เทสารละลายทั้งหมดลงในบิกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร นำไปปรับให้มีค่าความเป็นกรด 5.7 โดย ใช้ hydrogen chloride (HCl) ความเข้มข้น 0.1 N หรือ sodium hydroxide (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 N ช่วยในการปรับ หลังจากนั้นจึงนำสารละลายดังกล่าวไปต้ม ในกรณีที่ต้องการเตรียมเป็นอาหารเหลวให้ใส่เฉพาะน้ำตาลปริมาณ 30 กรัม/ลิตร ลงไปในสารละลายต้มจนละลาย แต่ถ้าต้องการเตรียมเป็นอาหารวุ้นให้ใส่วุ้นปริมาณ 8 กรัม/ลิตร ลงไปก่อน ต้มจนวุ้นละลายดีซึ่งจะสังเกตเห็นได้จากสารละลายมีลักษณะใส หลังจากนั้นจึงเติมน้ำตาลปริมาณ 30 กรัม/ลิตร ลงไปต้มต่อจนน้ำตาลละลาย แบ่งอาหารที่เตรียมดังกล่าวเทใส่ในหลอดทดลองขนาด 1 x 6 นิ้ว หลอดละ 10 มิลลิลิตร ในกรณีที่เป็นอาหารเหลวในหลอดทดลองจะใส่กระดาษกรองยี่ห้อ Whatman No.1 ซึ่งนำมาพับครึ่ง และพับอีกครั้งหนึ่งแล้วจึงนำมาหักพับเป็นรูปตัว M (ภาพที่ 9 ก. หน้า 38) สำหรับวางปลายยอดและทำหน้าที่ดูดอาหารเหลวขึ้นมาเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วย ปิดหุ้มหลอดทดลองแต่ละหลอด ด้วยพลาสติกทนร้อนซึ่งตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 7 x 7 เซนติเมตร หุ้มทับด้วยกระดาษและรัดด้วยยางรัดของ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันที่ความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. **วิธีการศึกษา**

ทำการศึกษาโดยแยกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ

1. **ศึกษาการเจริญของปลายยอดที่เริ่มเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ** โดยแบ่งการศึกษาเป็น 2 การทดลองคือ

การทดลองที่ 1 ศึกษาการเจริญของปลายยอดเมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้น

การทดลองที่ 2 ผลของสภาพทางกายภาพของอาหารต่อการเจริญของยอดที่เลี้ยง (รายละเอียดของแต่ละการทดลอง ดูข้อ 6.1)

2. **ศึกษาผลของส่วนประกอบของอาหารที่มีต่อการเจริญ และการแตกหน่อของต้น** โดยแบ่งการศึกษาเป็น 3 การทดลองคือ

การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของวิตามินสูตร MS (1962) ดัดแปลงที่มีต่อชิ้นส่วนที่ใช้เลี้ยง

การทดลองที่ 4 ศึกษาผลของ BAP ที่ระดับต่าง ๆ

การทดลองที่ 5 ศึกษาผลของระดับ NH_4NO_3 ควบคู่กับระดับอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยง (รายละเอียดของแต่ละการทดลอง ดูข้อ 6.2)

3. **ศึกษาการชักนำให้เกิดราก** โดยแบ่งการศึกษาเป็น 4 การทดลองคือ

การทดลองที่ 6 ศึกษาผลของ NAA ที่ระดับต่าง ๆ ในอาหารและสภาพแสงที่ใช้เลี้ยง

การทดลองที่ 7 ศึกษาผลของ NAA + IBA ที่ระดับต่าง ๆ

การทดลองที่ 8 ศึกษาวิธีการย้ายปลูก (รายละเอียดของแต่ละการทดลอง ดูข้อ 6.3)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.1 **ศึกษาการเจริญของปลายยอดที่เริ่มเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ** มีรายละเอียดดังนี้

การทดลองที่ 1 ศึกษาลักษณะการเจริญของปลายยอดเมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้น

ก. พืชทดลอง

ใช้ตาข้างจากกิ่งพันธุ์กุหลาบมอญที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (ภาพที่ 6 หน้า 34) นำมาตัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ซึ่งตั้งอยู่ในตู้ปลอดเชื้อใช้กำลังขยาย 25 X โดยจะค่อย ๆ ลอกเปลือกหุ้มตาออกทีละชั้นด้วยมีดที่มีความบางและคมซึ่งทำได้โดยการตัดใบมีดโกนเป็นชิ้นเล็ก ๆ ยึดเข้ากับด้ามเข็มเขี่ย ลอกเปลือกหุ้มตาออกจนถึงชั้นในสุดซึ่งจะเห็นส่วนของหน่วยเติบโตและใบอ่อนอยู่รอบ ๆ หลังจากนั้นตัดเอาเฉพาะส่วนของหน่วยเติบโตและใบอ่อนประมาณ 1-2 คู่ คือ มีขนาดประมาณ 0.5 x 1 มิลลิเมตร แล้วนำไปเลี้ยงต่อไป (ภาพที่ 7 หน้า 35 และภาพที่ 8 หน้า 35)

ข. อาหารที่ใช้เลี้ยง

ใช้อาหารวุ้นสูตร KI ซึ่งเตรียมใส่หลอดขนาด 1 x 6 นิ้ว หลอดละ 10 มิลลิลิตร (วิธีเตรียมดูข้อ 5)

ค. วิธีการ

การทดลองนี้เป็นการศึกษา โดยวิธีสังเกตการเจริญของปลายยอดที่เลี้ยง จำนวน 10 ยอด โดยนำปลายยอดที่ตัดในข้อ ก. มาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร KI หลอดละ 1 ยอด ทำการปิดหลอดด้วยแผ่นพลาสติกที่ฆ่าเชื้อแล้ว และรัดด้วยยางรัดของแล้วนำไปเก็บในห้องเลี้ยง

ง. สภาพการเลี้ยง

วางหลอดทดลองไว้บนชั้นสำหรับวางเนื้อเยื่อ ซึ่งติดหลอดฟลูออเรสเซนต์ ชั้นละ 3 หลอด โดยมีระยะห่างจากหลอดทดลอง 1 ฟุต ความเข้มแสง 2 กิโลลักซ์ โดยให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิที่เลี้ยงเฉลี่ย 28 ± 2 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

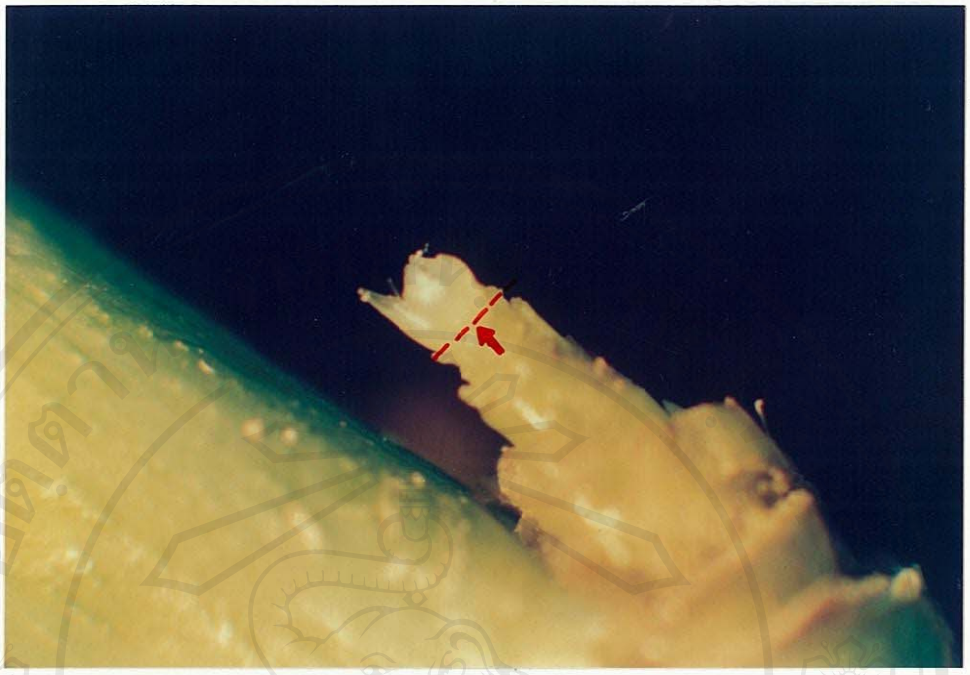
จ. การบันทึกผล

ทำการบันทึกผลทุก ๆ 1 เดือน โดยบันทึกลักษณะการเจริญของปลายยอดจากความสูง ซึ่งวัดประมาณค่าจากภายนอกหลอดทดลองเทียบกับมาตราส่วน

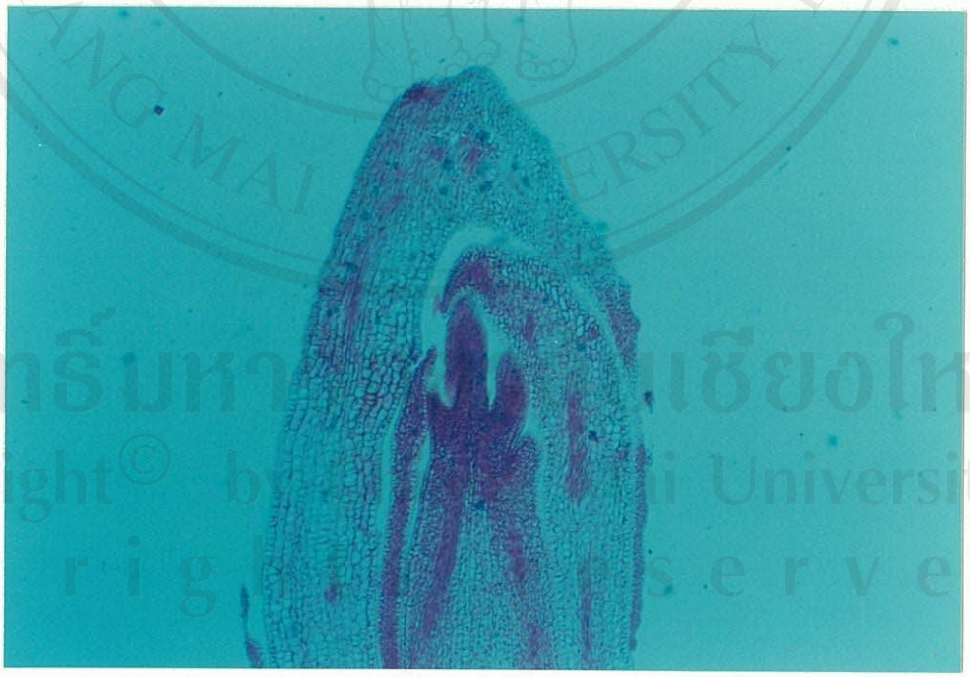
- บันทึกวันที่เริ่มแตกหน่อ
- จำนวนหน่อที่เกิด
- ลักษณะอื่น ๆ ที่สังเกตพบเช่น การเกิดแคลลัส และจำหน่วนต้นที่พบการฉ่ำน้ำ เป็นต้น

ภาพที่ 6 ตากุหลาบซึ่งมีส่วนของเปลือกตาห่อหุ้มอยู่ (10 X)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 7 ปลายยอดที่นำมาเลี้ยงซึ่งประกอบด้วยหน่วยเติบโตของยอด (meristem) และส่วนของใบอ่อน (leaf primordia) (16 X)



ภาพที่ 8 ภาพตัดตามยาวของตากุหลาบซึ่งมีใบอ่อนหุ้มส่วนของปลายยอด (58 X)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 ผลของสภาพทางกายภาพของอาหารที่มีต่อการเจริญของปลายยอดที่เลี้ยง

ก. พืชทดลอง

ใช้ปลายยอดขนาด 0.5 x 1 มิลลิเมตร (วิธีการเตรียมเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1)

ข. อาหารที่ใช้เลี้ยง

ใช้อาหารวุ้นและอาหารเหลวสูตร KI (วิธีเตรียมดูข้อ 5) โดยเพิ่มส่วนของสารละลายวิตามินสูตร MS (1962) ดัดแปลงความเข้มข้น 100 X (วิธีเตรียมดูข้อ 4.3) ลงไปด้วย ในปริมาณ 10 มิลลิลิตร/ลิตร อาหารวุ้นเตรียมใส่หลอดขนาด 1 x 6 นิ้ว หลอดละ 10 มิลลิลิตร ส่วนปริมาณของอาหารเหลวจะใช้แตกต่างกันไป ตามความเหมาะสมกับอุปกรณ์ที่ใช้ คืออาหารเหลวที่เตรียมไว้สำหรับเลี้ยงปลายยอดโดยมีกระดาษกรองพับสำหรับวางเนื้อเยื่อจะใส่หลอดขนาด 1 x 6 นิ้ว หลอดละ 10 มิลลิลิตร ส่วนอาหารเหลวที่เตรียมไว้เลี้ยงปลายยอดโดยวางขวดไว้บนเครื่องเขย่าจะใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร โดยใส่อาหารเหลว 30 มิลลิลิตร/ขวด สำหรับอาหารเหลวที่เตรียมไว้เลี้ยงปลายยอด โดยวางหลอดทดลองไว้ในเครื่องหมุนจะใส่หลอดขนาด 1/2 x 6 นิ้ว หลอดละ 1 มิลลิลิตร (ภาพที่ 9 หน้า 38)

ค. วิธีการทดลอง

ศึกษาการเจริญของปลายยอดที่เลี้ยงบนอาหารวุ้น และในอาหารเหลวสูตร KI + วิตามินสูตร MS (1962) ดัดแปลง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) มี 4 กรรมวิธี (treatment) โดยแต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 เลี้ยงปลายยอดบนอาหารวุ้น

กรรมวิธีที่ 2 เลี้ยงปลายยอดบนกระดาษกรองซึ่งพับเป็นรูปตัว M มีขาจุ่มอยู่ในอาหารเหลว (ภาพที่ 9 ก.)

กรรมวิธีที่ 3 เลี้ยงปลายยอดในอาหารเหลวโดยวางขวดไว้บนเครื่องเขย่า (shaker) ซึ่งมีอัตราความเร็วประมาณ 100 รอบ/นาที (ภาพที่ 9 ข.)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 4 เลี้ยงปลายยอดในอาหารเหลว โดยวางหลอดไว้ในเครื่องหมุนซึ่งมีอัตราความเร็วประมาณ 21 รอบ/นาที (ภาพที่ 9 ค.)

ง. สภาพการเลี้ยง

กรรมวิธีที่ 1 และ 2 ได้รับแสงและอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ส่วนกรรมวิธีที่ 3 และ 4 จะไม่มีการให้แสงตลอดการทดลองเนื่องจากอุปกรณ์ที่ใช้ติดตั้งอยู่ในห้องซึ่งจัดไว้โดยเฉพาะและมีความจำเป็นต้องใช้ร่วมกับการทดลองอื่น ๆ แต่อุณหภูมิห้องเฉลี่ย 28 ± 2 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับกรรมวิธีที่ 1 และ 2

จ. การบันทึกผล

- บันทึกลักษณะการเจริญของปลายยอดจากความสูง ซึ่งวัดจากภายนอกหลอดทดลองเทียบกับมาตราส่วน
- บันทึกลักษณะอื่น ๆ ที่สังเกตพบ เช่น การเกิดแคลลัส จำนวนต้นที่พบและคุณภาพของต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ก. เลี้ยงโดยใช้กระดาษกรองพับสำหรับวางเนื้อเยื่อ

ข. เลี้ยงในอาหารเหลวโดยวางขวดไว้บนเครื่องเขย่า

ค. เลี้ยงในอาหารเหลวโดยวางหลอดทดลองในเครื่องหมุน

ภาพที่ 9 การเลี้ยงปลายยอดในอาหารเหลวโดยวิธีการต่าง ๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.2 **ศึกษาผลของส่วนประกอบของอาหารที่มีต่อการเจริญและการแตกหน่อของต้น** มีรายละเอียดดังนี้

การทดลองที่ 3 ทดลองศึกษาผลของวิตามินสูตร MS (1962) ดัดแปลงและชิ้นส่วนที่ใช้เลี้ยง

ก. พืชทดลอง

ใช้ยอด (shootlet) กุหลาบมอญซึ่งเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารวุ้นสูตร KI โดยเลือกต้นที่มีความสม่ำเสมอกัน และสูงประมาณ 1 เซนติเมตร ในการทดลองชิ้นส่วนที่นำมาเลี้ยงจะแยกเป็น 3 แบบ คือ เลี้ยงทั้งต้น และเลี้ยงโดยทำการตัดแบ่งต้นออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนยอดกับส่วนโคน

ข. อาหารที่ใช้เลี้ยง

ใช้อาหาร 2 สูตรคือ อาหารวุ้นสูตร KI และอาหารวุ้นสูตร KI + วิตามินสูตร MS (1962) ดัดแปลง ความเข้มข้น 100 X ในปริมาณ 10 มิลลิลิตร/ลิตร (วิธีเตรียมดูข้อ 4.3 และ 5) ใช้หลอดทดลองขนาด 1 x 6 นิ้ว ใส่อาหารหลอดละ 10 มิลลิลิตร

ค. วิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบแฟคตอเรียล โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (factorial in completely randomized design) กำหนดปัจจัยเป็น 2 อย่างคือ ชิ้นส่วนของพืชและอาหารที่ใช้เลี้ยง โดยชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเลี้ยงแบ่งเป็น 3 แบบ คือ ส่วนยอด ส่วนโคน และทั้งต้น (ไม่มีราก) อาหารที่ใช้เลี้ยงแบ่งเป็น 2 แบบ คืออาหารวุ้นสูตร KI ซึ่งมีและไม่มีวิตามิน MS (1962) ดัดแปลง การทดลองนี้มี 6 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 8 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 6 กรรมวิธีในการทดลองที่ 3

ชิ้นส่วนพืช / อาหาร	ส่วนโคน	ส่วนยอด	ทั้งต้น
ไม่มีวิตามิน	1	2	3
มีวิตามิน	4	5	6

ง. สภาพการเลี้ยง

สภาพแสงและอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเหมือนการทดลองที่ 1

จ. การบันทึกผล

- บันทึกวันที่เริ่มพบการแตกหน่อ
- จำนวนต้นที่มีการแตกหน่อ
- จำนวนหน่อเฉลี่ย/ต้น
- ความสูงเฉลี่ยของหน่อ
- ลักษณะอื่น ๆ ที่พบเช่น การเกิดแคลลัส และคุณภาพของใบ

การทดลองที่ 4 ศึกษาผลของ ไซโตคินิน BAP ที่ระดับต่าง ๆ ในอาหาร

ก. พืชทดลอง

ใช้ต้นพันธุ์กุหลาบมอญซึ่งปลูกเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารวุ้นสูตร KI โดยเลือกต้นที่มีความสม่ำเสมอกัน ความสูงของต้นประมาณ 1 เซนติเมตร

ข. อาหารที่ใช้เลี้ยง

ใช้อาหารวุ้นสูตร KI + วิตามินสูตร MS (1962) ดัดแปลงความเข้มข้น 100 X ในปริมาณ 10 มิลลิลิตร/ลิตร (วิธีเตรียมดูข้อ 4.3 และ 5) อาหารดังกล่าวจะเตรียมโดยปราศจากฮอร์โมนตัวอื่น ๆ คือ GA_3 และ NAA ยกเว้น BAP ซึ่งจะทำการปรับให้มีระดับต่าง ๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กัน ในช่วง 0 - 2 มิลลิกรัม/ลิตร วิธีเตรียมอาหารภาชนะที่ใช้เลี้ยง และปริมาณต่อหลอดใช้เหมือนกับการทดลองที่ 3

ค. วิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์มี 6 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่	1	ไม่ใส่ BAP		
กรรมวิธีที่	2	ใส่ BAP	0.25	มิลลิกรัม/ลิตร
กรรมวิธีที่	3	ใส่ BAP	0.5	มิลลิกรัม/ลิตร
กรรมวิธีที่	4	ใส่ BAP	1	มิลลิกรัม/ลิตร
กรรมวิธีที่	5	ใส่ BAP	1.5	มิลลิกรัม/ลิตร
กรรมวิธีที่	6	ใส่ BAP	2	มิลลิกรัม/ลิตร

ง. สภาพการเลี้ยง

สภาพแสงและอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเหมือนการทดลองที่ 1

จ. การบันทึกผล

ทำการบันทึกผลดังต่อไปนี้

- การเจริญของต้นเดิมโดยวัดจากความสูง
- วันที่เริ่มพบการแตกหน่อ
- จำนวนต้นที่พบการแตกหน่อ
- จำนวนหน่อเฉลี่ย/ต้น
- ความสูงเฉลี่ยของหน่อ
- ลักษณะอื่น ๆ ที่พบ เช่น การเกิดแคลลัส และคุณภาพของใบ

การทดลองที่ 5 ศึกษาผลของระดับ NH_4NO_3 ควบคู่กับระดับอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยง

ก. พืชทดลอง

ใช้ต้นพันธุ์กุหลาบมอญซึ่งปลูกเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารวุ้นสูตร KI โดยเลือกต้นที่ไม่มีรากที่มีความสม่ำเสมอกัน ความสูงของต้นประมาณ 1 เซนติเมตร

ข. อาหารที่ใช้เลี้ยง

ใช้อาหารวุ้นสูตร KI + วิตามินสูตร MS (1962) ดัดแปลง ความเข้มข้น 100 X ในปริมาณ 10 มิลลิลิตร/ลิตร (วิธีเตรียมข้อ 4.3 และ 5) โดยปรับระดับของ NH_4NO_3 ในธาตุอาหารหลักออกเป็นระดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ต่าง ๆ แยกตามการทดลอง ใช้หลอดทดลองและปริมาณอาหาร/หลอด เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3

ค. วิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ กำหนดปัจจัย 2 อย่างคือ NH_4NO_3 และอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงโดยแบ่งระดับของ NH_4NO_3 ในอาหารสูตร KI เป็น 5 ระดับ คือ 1/4, 1/2, 1 (ระดับปกติ) 1 1/2 และ 2 X และระดับของอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงแบ่งเป็น 3 ระดับ คือ 20, 24 และ 28 องศาเซลเซียส การทดลองนี้มี 15 กรรมวิธีแต่ละกรรมวิธีมี 7 ซ้ำ

ตารางที่ 7 กรรมวิธีในการทดลองที่ 5

ระดับ NH_4NO_3 / อุณหภูมิที่เลี้ยง (องศาเซลเซียส)	1/4 X	1/2 X	1 X	1 1/2 X	2 X
20	1	2	3	4	5
24	6	7	8	9	10
28	11	12	13	14	15

ง. สภาพการเลี้ยง

เลี้ยงโดยวางหลอดทดลองไว้ในตู้ ซึ่งมีการควบคุมอุณหภูมิและแสงภายในจะติดหลอดฟลูออเรสเซนต์ชั้นละ 3 หลอด โดยมีระยะห่างจากหลอดทดลอง 1/2 ฟุต ความเข้มแสง 2.5 กิโลลักซ์ ระยะเวลาที่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง อุณหภูมิภายในตู้จะแตกต่างกันไปตามวิธีการทดลองที่กำหนด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จ. การบันทึกผล

ทำการบันทึกผลดังนี้

- วันที่เริ่มพบการแตกหน่อ
- จำนวนต้นที่พบการแตกหน่อ
- จำนวนหน่อเฉลี่ย/ต้น
- ความสูงเฉลี่ยของหน่อ
- ลักษณะอื่นที่พบเช่น การเกิดแคลลัส และคุณภาพของต้น

6.3 **ศึกษาการชักนำให้เกิดราก** มีรายละเอียดดังนี้

การทดลองที่ 6 ศึกษาผลของออกซิน NAA ที่ระดับต่าง ๆ ในอาหารและสภาพแสงที่ใช้เลี้ยง

ก. พืชทดลอง

ใช้ต้นกุหลาบมอญซึ่งปลูกเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารวุ้นสูตร KI โดยเลือกต้นที่มีความสม่ำเสมอกัน ความสูงของต้น ประมาณ 1 เซนติเมตร

ข. อาหารที่ใช้เลี้ยง

ใช้อาหารวุ้นสูตร KI + วิตามินสูตร MS (1962) ดัดแปลง ความเข้มข้น 100 X ในปริมาณ 10 มิลลิลิตร/ลิตร (วิธีเตรียมดูข้อ 4.3 และ 5) อาหารดังกล่าวจะเตรียมโดยปราศจากฮอร์โมนตัวอื่น ๆ คือ BAP และ GA_3 ยกเว้น NAA ที่ระดับต่าง ๆ ในช่วง 0-2 มิลลิกรัม/ลิตร ภาชนะและปริมาณอาหารที่ใช้เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

ค. วิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบแฟคตอเรียล โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ กำหนดปัจจัย 2 อย่าง คือ ระดับของออกซิน NAA และสภาพแสงที่ใช้เลี้ยง โดยแบ่งระดับของออกซิน NAA เป็น 6 ระดับ คือ 0, 0.1, 0.5, 1, 1.5 และ 2 มิลลิกรัม/ลิตร และสภาพแสงที่ใช้เลี้ยงแบ่งเป็นเลี้ยงในที่มีแสงและในที่มืด การทดลองนี้มี 12 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ

ง. สภาพการเลี้ยง

อุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเหมือนการทดลองที่ 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จ. การบันทึกผล

ทำการบันทึกผลดังนี้

- วันที่เริ่มออกราก
- จำนวนรากที่เกิด
- ความยาวราก
- จุดเริ่มต้นของการเกิดรากโดยทำการศึกษาด้วยวิธีทางเซลวิทยา

ตารางที่ 8 กรรมวิธีในการทดลองที่ 6

NAA มิลลิกรัม/ลิตร / แสง	0	0.1	0.5	1	1.5	2
สว่าง	1	2	3	4	5	6
มืด	7	8	9	10	11	12

การทดลองที่ 7 ศึกษาผลร่วมของ NAA + IBA ที่ระดับต่าง ๆ ในอาหาร

ก. พืชทดลอง

ใช้ต้นกุหลาบมอญซึ่งปลูกเลี้ยง ในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารวุ้นสูตร KI โดยเลือกยอดที่มีความสม่ำเสมอกัน ความสูงของต้นประมาณ 1 เซนติเมตร

ข. อาหารที่ใช้เลี้ยง

ใช้อาหารวุ้นสูตร KI + วิตามินสูตร MS (1962) ดัดแปลง ความเข้มข้น 100 X ในปริมาณ 10 มิลลิลิตร/ลิตร (วิธีเตรียมดูข้อ 4.3 และ 5) อาหารดังกล่าวจะเตรียมโดยปราศจาก BAP และ GA_3 แต่จะทำการปรับระดับของออกซินคือ NAA และ IBA ร่วมกันที่ระดับต่าง ๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในช่วง 0-0.4 มิลลิกรัม/ลิตร ภาชนะและปริมาณอาหารใช้เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

ค. วิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์มี 2 ปัจจัย คือ NAA และ IBA โดยแต่ละปัจจัยมีความเข้มข้น 5 ระดับ ดังนี้ 0, 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.4 รวมเป็น 25 กรรมวิธี โดยแต่ละกรรมวิธีมี 8 ซ้ำ

ตารางที่ 9 กรรมวิธีในการทดลองที่ 7

IBA มิลลิกรัม/ลิตร / NAA มิลลิกรัม/ลิตร	0	0.05	0.1	0.2	0.4
0	1	2	3	4	5
0.05	6	7	8	9	10
0.1	11	12	13	14	15
0.2	16	17	18	19	20
0.4	21	22	23	24	25

ง. สภาพการเลี้ยง

อุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเหมือนการทดลองที่ 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จ. บันทึกผล

ทำการบันทึกผลดังต่อไปนี้

- วันที่เริ่มออกราก
- จำนวนรากที่เกิด
- ความยาวรากและสีของราก

การทดลองที่ 8 ศึกษาวิธีการย้ายปลูก

ก. พืชทดลอง

ใช้ต้นกุหลาบมอญจากผลการทดลองที่ 6 และที่ 7 ซึ่งพบว่าเกิดราก

ข. เครื่องปลูก

ใช้ทรายซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้วด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่ความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว โดยบรรจุทรายในกล่องพลาสติกขนาด 25 x 14 x 8 เซนติเมตร ที่ก้นและฝากล่องเจาะรูขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ให้รูห่างกัน 5 เซนติเมตร (ภาพ 26 หน้า 84) รูที่ก้นกะบะใช้ให้น้ำจากกะบะผ่านขึ้นมายังเครื่องปลูก ส่วนรูที่ฝาช่วยในการระบายความร้อน

ค. วิธีการย้ายปลูก

ทำโดยนำต้นย้ายออกปลูกในสภาพต่าง ๆ ดังนี้

1. ปักชำในทรายซึ่งบรรจุกล่องพลาสติกปิดฝา ช่วยรักษาความชื้นในระยะแรก
2. ปักชำในทราย ซึ่งบรรจุกล่องพลาสติกใช้แปลงพ่นหมอกช่วยรักษาความชื้น

ง. บันทึกผล

เมื่อย้ายต้นได้ 1 สัปดาห์ นับจำนวนต้นที่รอดตายหลังย้ายปลูกโดยคิดเป็นร้อยละ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved