บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 กิ่งอ่อนส้มโอจากต้นพันธุ์ในแปลงปลูก

1.2 ตู้กรองอากาศ (air flow cabinet)

1.3 ตะแกรงเหล็กใส่หลอดแก้ว

1.4 ชั้นสำหรับวางตะแกรง

1.5 เครื่องชั่งชนิดละเอียด (analytical balance)

1.6 เครื่องชั่งไฟฟ้า (electrical balance) ชั่งได้ถึง 0.1 มก.

1.7 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง

1.8 เตาไฟฟ้า

1.9 หม้อนึ่งความดันไอ

1.10 เครื่องฝานเนื้อเยื่อแช่แข็ง (freezing microtome)

1.11 กล้องจุลทรรศน์

1.12 เครื่องวัดแก๊ซ (gas chromatographer)

1.13 หลอดทดลองขนาด 25 x 150 มม

1.14 เครื่องแก้วอื่นๆ เช่น บิกเกอร์ กระบอกวัดปริมาตร ปิเปต ขวดวัดปริมาตร กรวยแก้ว ขวดใส่สารละลายเข้มข้น จานเลี้ยงเชื้อ แท่งแก้วคน ขวดรูปชมพู่ เข็มฉีดยา ฯลฯ

1.15 วัสดุที่ใช้ในตู้กรองอากาศ ได้แก่ ตะเกียงแอลกอฮอล์ ปากคีบ ขนาดยาว 140 และ 180 มม ด้ามเข็มเขี่ย ใบมีดโกนที่ตัดเป็นใบมีดขนาด 2 x 10 มม แท่งทองเหลืองสำหรับเสียบด้ามเข็มเขี่ยและวางปากคีบ กระดาษกรอง Whatman

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เบอร์ 3 แผ่นพลาสติกใส ขนาด 70 x 90 มม หลอดทดลองใส่แอลกอฮอล์ขนาด 25 x 150 มม จานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 100 และ 150 มม ฯลฯ

1.16 วัสดุอื่นๆ เช่นช้อนตักสาร กระดาษอลูมินัมฟอยล์ชนิดพิเศษที่มีช่องผ่านเข้าออกของก๊าซและไอน้ำได้ ฝาโลหะปิดหลอดแก้ว สำลี ยางรัดของ กระดาษกาวเขียนกรรมวิธีติดหลอดทดลอง ฯลฯ

2. สารเคมี

2.1 สารที่ใช้ทำความสะอาดฆ่าเชื้อ

2.1.1 Ethanol เข้มข้น 70%

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

2.1.3 สารจับใบ Tween 20 ของบริษัทสากลเคมีภัณฑ์และการค้าจำกัด

2.2 สารที่ใช้สำหรับเตรียมอาหาร

2.2.1 เกลือให้ธาตุอาหารหลักต่างๆ ตามสูตร SH (1972)

2.2.2 เกลือให้ธาตุอาหารรองต่างๆ ตามสูตร MS (1962)

2.2.3 วิตามินต่างๆ ตามสูตร MS (1962)

2.2.4 Ferrous sulfate ของบริษัท J.T. Baker Chemical Co., Philipsburg N.J., U.S.A.

2.2.5 Ethylene diamine tetraacetic acid diNa-Salt dihydrate ของบริษัท Koch - light Laboratories Ltd., England

2.2.6 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

2.2.6.1 Benzyl aminopurine (BAP) ของบริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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

2.2.7 น้ำมะพร้าว

2.2.8 สารสกัดมอลท์ (Malt extract)

2.2.9 น้ำกลั่นที่กลั่นจากเครื่องแก้ว

2.2.10 Potassium hydroxide (KOH) 1 N

2.2.11 Hydrochloric acid (HCl) 1 N

2.2.12 ผงวุ้นตราเฮลิคอปเตอร์

2.2.13 น้ำตาลซูโครส

2.3 สารที่ใช้ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

2.3.1 Tissue - Tek ของบริษัท Miles U.S.A.

3. การเตรียมพืชทดลอง

เตรียมกิ่งอ่อนส้มโอจากต้นพันธุ์ที่ปลูกเลี้ยงในบริเวณศูนย์วิจัยพืชสวน จังหวัดเชียงราย โดยคัดเลือกกิ่งอ่อนในระยะใบอ่อนเริ่มเปิดแผ่นใบ และปราศจากโรคและรอยกัดของแมลง นำมาปลิดใบอ่อนและก้านใบออกให้หมด (ภาพที่ 1 หน้า 23) ล้างทำความสะอาดครั้งแรกด้วยน้ำที่ไหลตลอดเวลา แล้วทำการฆ่าเชื้อที่ผิวของกิ่งพันธุ์โดยการนำมาแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ที่มีความเข้มข้น 10% เติมด้วย Tween 20 0.1% เป็นเวลานาน 10 นาที หลังจากนั้นจึงนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง โดยทำในตู้ปลอดเชื้อ และทำการตัดเพื่อการทดลองต่อไป ตัดส่วนยอด ใบอ่อนและก้านใบที่เหลือออกทิ้ง จนเหลือใบอ่อนที่มองเห็นด้วยตาเปล่าเพียง 2-3 ใบ ตัดส่วนของยอดโดยวัดจากปลายยอดลงมา 5 มม สำหรับส่วนของข้อ ทำการตัดด้านบนโดยตัดที่ระดับเหนือข้อให้ชิดหนาม ให้มีขนาดชิ้นส่วนข้อยาว 5 มม หนึ่งข้อต่อหนึ่งชิ้นส่วน ส่วนการตัดยอดที่เจริญจากตาข้างของข้อ จะตัดชิดกับข้อเดิมโดยไม่มีส่วนของหนามติดมาด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 1 กิ่งอ่อนส้มโอก่อนและหลังการปลิดใบอ่อนและก้านใบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution)

4.1 การเตรียมธาตุอาหารหลัก

เตรียมธาตุอาหารหลักที่ใช้ในสูตร SH (1972) แยกกัน โดยให้แต่ละชนิดมีความเข้มข้น 1 โมลาร์ ทำการเตรียมน้ำยาชนิดละ 200 มล โดยใช้ปริมาณสารดังต่อไปนี้

ตารางที่ 1 ชนิดและปริมาณของสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร SH (1972)

ชนิดสาร	ปริมาณสารแต่ละตัวในน้ำยาเข้มข้น 1 โมลาร์ของสูตร SH (1972) (ก)	ปริมาณสารในน้ำยา 200 มล (ก)
KNO_3	101.11	20.222
$MgSO_4.7H_2O$	246.48	49.296
$(NH_4)H_2PO_4$	115.03	23.006
$CaCl_2.2H_2O$	147.02	29.404

4.2 การเตรียมธาตุอาหารรอง

เตรียมธาตุอาหารรองสูตร MS (1962) โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน โดยให้ความเข้มข้นของสารเป็น 100 x ของสารละลายมาตรฐานเตรียมให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 ชนิดและปริมาณของสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรองสูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาเข้มข้น 100 X (มก/ล)
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	2.5
KI	0.830	83
$ZnSO_4.7H_2O$	8.600	860
$MnSO_4.4H_2O$	22.300	2,230
H_3BO_3	6.200	620
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.250	25
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	2.5

4.3 การเตรียมวิตามิน

เตรียมวิตามินสูตร MS (1962) ดัดแปลง โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน โดยให้ความเข้มข้นของสารเป็น 100 x ของความเข้มข้นมาตรฐาน เตรียมให้มีปริมาตรสุดท้าย 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 100 x (มก/ล)
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 $FeSO_4.7H_2O$ และ $Na_2EDTA.2H_2O$ โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน ปริมาณสารเข้มข้นเป็น 100 x โดยชั่งสารแต่ละชนิดตามที่กำหนด ละลายในน้ำให้มีปริมาตรสุดท้ายของแต่ละส่วน 500 มล การละลายสารกระทำในสภาพที่มีแสงน้อยที่สุด แล้วนำสารละลายทั้งสองมาผสมรวมในขวดเดียวกัน และเก็บสารละลายในที่มืดโดยการหุ้มขวดด้วยกระดาษอลูมินัมให้มิดชิดเพื่อป้องกันแสง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4 ชนิดและปริมาณของสารละลายเหล็กเข้มข้นสูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารใน สูตร MS (1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาเข้มข้น 100 x (ก/ล)
$FeSO_4.7H_2O$	27.8	2.78
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.3	3.73

4.5 การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต

4.5.1 การเตรียม BAP

ชั่ง BAP 20 มก ละลายด้วยสารละลาย 1N KOH เล็กน้อย สำหรับให้ละลายได้หมดแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 200 มล ด้วยน้ำกลั่นสำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริง ดูรายละเอียดจากแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในการทดลอง

4.5.2 การเตรียม IBA

ชั่ง IBA 10 มก ละลายด้วย absolute ethanol เล็กน้อย สำหรับให้ละลายได้หมดแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มล สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริง ดูรายละเอียดจากแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในการทดลอง

4.5.3 การเตรียม GA_3

ชั่ง GA_3 10 มก ละลายด้วย absolute ethanol เล็กน้อย สำหรับละลายได้หมด แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริง ดูรายละเอียดจากแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การเตรียมอาหารพื้นฐานสูตร I

ใส่น้ำกลั่นลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 1,000 มล ประมาณ 1/3 ของขวดแล้วเติมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักแต่ละชนิดลงไป (ตารางที่ 5 หน้า 29) โดยเขย่าขวดให้น้ำยาผสมกันดีในแต่ละครั้งที่เติม แล้วเพิ่มน้ำกลั่นลงไปอีกเพื่อกันการตกตะกอนก่อนที่จะเติมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรอง วิตามิน เหล็ก และสารควบคุมการเจริญเติบโตลงไปตามลำดับ แล้วจึงเติมน้ำมะพร้าวและละลายสารสกัดมอลท์ด้วยน้ำกลั่นลงไป จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปอีกจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล เทสารละลายลงในบิกเกอร์ ขนาด 2,000 มล นำไปปรับค่าความเป็นกรดให้ได้ 5.7 โดยใช้ 1 N HCl หรือ 1 N KOH ในการเตรียมเป็นอาหารเหลว หลังจากปรับค่าความเป็นกรดแล้วให้ใส่น้ำตาลซูโครสลงไปแล้วคนให้ละลาย ถ้าเตรียมเป็นอาหารแข็งก็ใส่ผงวุ้นลงไปในสารละลายแล้วนำไปต้มให้วุ้นละลายก่อนที่จะใส่น้ำตาลลงไป ต้มต่อจนน้ำตาลละลาย ตวงแบ่งอาหารใส่หลอดทดลองขนาด 25 x 150 มม หลอดละ 10 มล ในกรณีอาหารเหลว จะใส่กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ซึ่งนำมาพับครึ่งและพับอีกครึ่งหนึ่งแล้วหักพับเป็นรูปตัว M สำหรับวางชิ้นส่วนพืช ปิดหุ้มหลอดทดลองด้วยแผ่นพลาสติกใสทนร้อน ขนาด 70 x 90 มม รัดด้วยยางรัดของ และรัดรวมกัน 5 หลอดและหุ้มทับด้วยกระดาษลอกลายขนาด 120 x 120 มม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่ 15 ป/น^2 (ปอนด์/ตารางนิ้ว) นาน 15 น (นาที)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบของสารละลายเข้มข้นแต่ละชนิดในอาหารสูตร I

ชนิดของสารละลาย	ปริมาณสารละลายเข้มข้นในอาหาร (มล/ล)
ธาตุอาหารหลัก สูตร SH (1972) ความเข้มข้นชนิดละ 1 โมลาร์	
KNO_3	24.7
$MgSO_4.7H_2O$	1.6
$(NH_4)H_2PO_4$	2.6
$CaCl_2.2H_2O$	1.4
ธาตุอาหารรอง เหล็ก และวิตามิน สูตร MS(1962) ความเข้มข้นชนิดละ 100 x	
ธาตุอาหารรอง	10
เหล็ก	10
วิตามิน	10
สารควบคุมการเจริญเติบโต	
BAP (20 มก/200 มล)	10 (1 มก/ล)
IBA (10 มก/100 มล)	2.5 (0.25 มก/ล)
GA_3 (10 มก/100 มล)	1 (0.1 มก/ล)
น้ำมะพร้าว	200
สารสกัดมอลท์	500 (มก/ล)
น้ำตาลซูโครส	50,000 มก
วุ้น	70 มก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. วิธีการวิจัย

6.1 **การทดลองที่ 1** การศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของตาข้างส้มโอ 6 พันธุ์

6.1.1 อาหาร

ใช้อาหารวุ้นสูตร I โดยเตรียมใส่หลอดทดลองขนาด 25 x 150 มม หลอดละ 10 มล

6.1.2 วิธีการทดลอง

ชิ้นส่วนพืชในการทดลอง ใช้ส่วนข้อของส้มโอ 6 พันธุ์ (วิธีเตรียมดูข้อ 3) ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พันธุ์ขาวพวง

กรรมวิธีที่ 2 พันธุ์ขาวแป้น

กรรมวิธีที่ 3 พันธุ์ขาวใหญ่

กรรมวิธีที่ 4 พันธุ์พื้นเมือง 1

กรรมวิธีที่ 5 พันธุ์พื้นเมือง 2

กรรมวิธีที่ 6 พันธุ์ขาวทองดี

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ รวม 6 กรรมวิธี ทดลอง 10 ซ้ำใน แต่ละกรรมวิธี

6.1.3 การบันทึกผลเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

บันทึกการเจริญเติบโตของตาข้างดังนี้

6.1.3.1 % การแตกตา

6.1.3.2 วัดความยาวยอดใหม่

6.1.3.3 นับจำนวนใบ

6.1.3.4 วัดขนาดใบที่ใหญ่ที่สุด

6.1.3.5 นับจำนวนตา/ชิ้นส่วน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.1.3.6 นับจำนวนยอด/ชิ้นส่วน

6.1.3.7 บันทึกลักษณะอื่นๆ เช่น สีของใบ การหลุดร่วงของใบ และ/หรือยอด

6.2 **การทดลองที่ 2** การศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของตาข้างส้มโอในตำแหน่งข้อที่ต่างกัน

6.2.1 อาหาร

เหมือนการทดลองที่ 1

6.2.2 วิธีการทดลอง

ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อที่ผิว กิ่งอ่อนส้มโอพันธุ์ขาวทองดีตามวิธีข้อ 3 แล้วนำไปตัดเป็นชิ้นให้มีขนาด 5 มม โดยตัดยอด และข้อเรียงตามลำดับจากยอดถึงข้อลำดับที่ 9 แต่ละชิ้นมีเพียงหนึ่งข้อ ยกเว้นชิ้นส่วนยอด การตัดยอดและข้อเรียงตามลำดับดังนี้

กรรมวิธีที่ 1	ยอด
กรรมวิธีที่ 2	ข้อตำแหน่งที่ 1
กรรมวิธีที่ 3	ข้อตำแหน่งที่ 2
กรรมวิธีที่ 4	ข้อตำแหน่งที่ 3
กรรมวิธีที่ 5	ข้อตำแหน่งที่ 4
กรรมวิธีที่ 6	ข้อตำแหน่งที่ 5
กรรมวิธีที่ 7	ข้อตำแหน่งที่ 6
กรรมวิธีที่ 8	ข้อตำแหน่งที่ 7
กรรมวิธีที่ 9	ข้อตำแหน่งที่ 8
กรรมวิธีที่ 10	ข้อตำแหน่งที่ 9

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ รวม 10 กรรมวิธี โดยทดลองอย่างน้อย 5 ซ้ำในแต่ละกรรมวิธี

6.2.3 **การบันทึกผล**

6.2.3.1 บันทึกลักษณะการเจริญของตาข้างเหมือนการทดลองที่ 1 ตามข้อ 6.1.3.1 - 6.1.3.7

6.2.3.2 นำตัวอย่างก่อนและหลังการเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ไปทำการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

6.3 การทดลองที่ 3 ผลของวัสดุปิดหลอดที่มีต่อการเจริญเติบโตของตาข้างจากข้อส้มโอที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

ทำการเลี้ยงข้อส้มโอพันธุ์ขาวทองดี โดยแยกเป็น การทดลองย่อยดังนี้

6.3.1 ผลของวัสดุปิดหลอด 4 ชนิด ที่มีต่อการเจริญของยอดที่เกิดจากตาข้างของข้อส้มโอ

โดยนำยอดที่เกิดจากการเลี้ยงข้อส้มโอพันธุ์ขาวทองดี บนอาหารวุ้นเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ย้ายมาเลี้ยงและปิดหลอดทดลองด้วยวัสดุต่างๆ กันดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 จุกสำลี

กรรมวิธีที่ 2 แผ่นพลาสติกใส

กรรมวิธีที่ 3 กระดาษอลูมินัมฟอยล์ชนิดพิเศษ

กรรมวิธีที่ 4 แผ่นพลาสติกใสครอบด้วยฝาโลหะ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ รวม 4 กรรมวิธี โดยทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละกรรมวิธี

6.3.1.1 การบันทึกผล

6.3.1.1.1 วัดปริมาณก๊าซออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และเอทธิลีนในหลอดแก้วเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.3.1.1.2 บันทึกลักษณะอื่นๆ เช่น สีของใบ การหลุดร่วงของใบและ/หรือยอด

6.3.2 ผลของวัสดุปิดหลอด 3 ชนิด ที่มีต่อการเจริญของตาข้างจากข้อส้มโอ

ทำการตัดข้อของส้มโอพันธุ์ขาวทองดีเลี้ยงบนอาหารวุ้นในหลอดทดลองเช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 1 และปิดหลอดทดลองด้วยวัสดุต่างๆ กันดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 จุกสำลี

กรรมวิธีที่ 2 จุกสำลีครอบด้วยฝาโลหะ

กรรมวิธีที่ 3 กระดาษอลูมินัมฟอยล์ชนิดพิเศษ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ รวม 3 กรรมวิธี โดยทดลอง 5 ซ้ำในแต่ละกรรมวิธี

6.3.2.1 การบันทึกผล

6.3.2.1.1 วัดหาปริมาณก๊าซออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และเอทธิลีน ทุกๆ วันเว้นวันในสัปดาห์แรก และเมื่อครบสัปดาห์ต่อๆ ไป จนสิ้นสุดการทดลอง

6.3.2.1.2 ลักษณะอื่นๆ เช่น การร่วงของใบและ/หรือยอด

6.3.3 ผลของฝาจุกสำลีและแผ่นพลาสติกใสที่มีต่อการเจริญของตาข้างจากข้อส้มโอ

โดยทำการตัดข้อส้มโอพันธุ์ขาวทองดี เลี้ยงบนอาหารวุ้นในหลอดทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 และปิดหลอดทดลองด้วยวัสดุต่างๆ กันดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 จุกสำลี

กรรมวิธีที่ 2 แผ่นพลาสติกใส

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ รวม 2 กรรมวิธี ทดลอง 5 ซ้ำในแต่ละกรรมวิธี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.3.3.1 การบันทึกผล

6.3.3.1.1 บันทึกลักษณะการเจริญเติบโตของยอดที่เกิดจากตาข้างเหมือนการทดลองที่ 1 ตามข้อ 6.1.3.2 - 6.1.3.7

6.4 **การทดลองที่ 4** หาความสัมพันธ์ระหว่างก๊าซเอทธิลีน คาร์บอนไดออกไซด์ และออกซิเจน ที่เกิดในหลอดทดลองต่อการเจริญเติบโตของข้อสัมโอ

ทำการเลี้ยงข้อสัมโอพันธุ์ขาวทองดีบนอาหารวุ้นในหลอดทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ปิดหลอดทดลองด้วยแผ่นพลาสติกใส

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยทำจำนวน 5 ซ้ำ

6.4.1 การบันทึกผล

6.4.1.1 วัดหาปริมาณก๊าซออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และเอทธิลีน ภายหลังการเลี้ยงครบ 1 วัน และทุกๆ เว้นวันจนครบ 2 สัปดาห์ และเมื่อครบ 3 และ 4 สัปดาห์

6.5 **การทดลองที่ 5** การหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการย้ายชิ้นส่วนสัมโอที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

ทำการเลี้ยงข้อสัมโอพันธุ์ขาวทองดี บนอาหารวุ้น ในหลอดทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ปิดหลอดทดลองด้วยแผ่นพลาสติกใส แล้วทำการย้ายไปเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิม ในระยะเวลาต่างๆ กัน ดังนี้

6.5.1 วิธีการทดลอง

กรรมวิธีที่ 1 ย้ายทุก 3 วัน

กรรมวิธีที่ 2 ย้ายทุก 5 วัน

กรรมวิธีที่ 3 ย้ายทุก 7 วัน

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ รวม 3 กรรมวิธี โดยทดลองอย่างน้อย 10 ซ้ำในแต่ละกรรมวิธี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.5.2 การบันทึกผล

6.5.2.1 บันทึกลักษณะการเจริญเติบโตของตาข้าง เหมือนการทดลองที่ 1 ตามข้อ 6.1.3.2 - 6.1.3.7

6.6 **การทดลองที่ 6** การศึกษาเปรียบเทียบสภาพทางกายภาพของอาหาร ที่มีต่อการเจริญเติบโตของข้อส้มโอ

ทำการเลี้ยงข้อส้มโอ ในหลอดทดลอง เช่นเดียวกับการทดลองที่ ปิดหลอดทดลองด้วยจุกสำลี

6.6.1 อาหาร

ใช้อาหารเหลวและอาหารวุ้น ตามที่ใช้ในการทดลองที่ 1 โดยปรับปริมาณวุ้นตามกรรมวิธีทดลอง

6.6.2 วิธีการทดลอง

กรรมวิธีที่ 1 เลี้ยงในอาหารเหลวบนกระดาษกรองพับ

กรรมวิธีที่ 2 อาหารที่มีวุ้น 0.3 %

กรรมวิธีที่ 3 อาหารที่มีวุ้น 0.5 %

กรรมวิธีที่ 4 อาหารที่มีวุ้น 0.7 %

กรรมวิธีที่ 5 อาหารที่มีวุ้น 1.0 %

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ รวม 5 กรรมวิธี โดยทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำในแต่ละกรรมวิธี

6.6.3 การบันทึกผล

6.6.3.1 บันทึกผลการทดลองลักษณะการเจริญของตาข้างส้มโอ เช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 1 ตามข้อ 6.1.3.2 - 6.1.3.7

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.7 **การทดลองที่ 7** ผลของออกซิน IBA ที่มีต่อคุณภาพของตาที่เกิดใหม่ จากการเลี้ยงข้อส้มโอพันธุ์ขาวทองดี

6.7.1 อาหาร

ทำการเลี้ยงข้อส้มโอพันธุ์ขาวทองดี บนอาหารวุ้นเช่นเดียวกับที่ใช้ในการทดลองที่ 1 แต่ปรับระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตเฉพาะออกซิน IBA ปิดหลอดด้วยจุกสำลี

6.7.2 วิธีการทดลอง

กรรมวิธีที่ 1 IBA 0 มก/ล

กรรมวิธีที่ 2 ใส่ IBA 0.0025 มก/ล

กรรมวิธีที่ 3 ใส่ IBA 0.025 มก/ล

กรรมวิธีที่ 4 ใส่ IBA 0.25 มก/ล

กรรมวิธีที่ 5 ใส่ IBA 2.5 มก/ล

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ รวม 5 กรรมวิธี โดยทดลองอย่างน้อย 5 ซ้ำในแต่ละกรรมวิธี

6.7.3 การบันทึกผล

6.7.3.1 บันทึกลักษณะการเจริญเติบโตของตาข้าง เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ตามข้อ 6.1.3.1 - 6.1.3.7

6.8 **การทดลองที่ 8** ผลของ BAP และ GA_3 (โดยไม่เติม IBA ในอาหาร) ต่อการเจริญเติบโตและการเกิดยอดของตาข้างจากการเลี้ยงข้อส้มโอพันธุ์ขาวทองดี

6.8.1 อาหาร

ใช้อาหารวุ้นสูตรเช่นเดียวกันที่ใช้ในการทดลองที่ 1 แต่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้เพียง 2 ชนิด คือ GA_3 และ BAP โดยปรับระดับของ BAP อยู่ในช่วง 0.1 - 10.0 มก/ล ส่วน GA_3 ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1 - 5.0 มก/ล ใช้ภาชนะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และปริมาตรอาหาร/หลอด เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ปิดหลอดทดลองด้วยจุกสำลี

6.8.2 วิธีการทดลอง

ทำการทดลองความเข้มข้นที่เหมาะสมจากสัดส่วนของ BAP 3 ระดับ คือ 0.1, 1.0 และ 10.0 มก/ล ร่วมกับ GA_3 4 ระดับ คือ 0.1, 0.5, 1.0 และ 5.0 มก/ล วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมกันโดยสุ่มสมบูรณ์ รวม 12 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมีอย่างน้อย 5 ซ้ำ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 แสดงกรรมวิธีในการทดลองที่ 8

GA_3 (มก/ล) \ BAP (มก/ล)	0.1	1.0	10.0
0.1	กรรมวิธีที่ 1	2	3
0.5	4	5	6
1.0	7	8	9
5.0	10	11	12

6.8.3 การบันทึกผล

6.8.3.1 บันทึกลักษณะการเกิดและการเจริญเติบโตของยอดจากตาข้างของข้อ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ตามข้อ 6.1.3.1 - 6.1.3.7

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.9 **การทดลองที่ 9** ผลของน้ำตาลและน้ำมะพร้าวที่มีต่อการเจริญและการเกิดยอดจากตาข้าง จากการเลี้ยงข้อส้มโอพันธุ์ขาวทองดี

6.9.1 อาหาร

ใช้อาหารวุ้นสูตรเช่นเดียวกันที่ใช้ในการทดลองที่ 1 ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 แต่เพิ่มและปรับปริมาณน้ำตาลซูโครสและน้ำมะพร้าวให้มีความเข้มข้นระดับต่างๆกัน โดยใช้น้ำมะพร้าวในปริมาณ 0-20 % (ปริมาตร/ ปริมาตร) และน้ำตาลซูโครสที่ปริมาณ 3 - 7% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ใช้ภาชนะและปริมาณอาหารเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

6.9.2 วิธีการทดลอง

ทำการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมะพร้าว 3 ระดับ คือ 0 10 และ 20 % (ปริมาตร/ปริมาตร) ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 3 ระดับ คือ 3 5 และ 7 % (น้ำหนัก/ปริมาตร)

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมกัน โดยสุ่มสมบูรณ์รวม 9 กรรมวิธี ทำการทดลองอย่างน้อย 5 ซ้ำในแต่ละกรรมวิธี (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 แสดงกรรมวิธีในการทดลองที่ 9

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.9.3 การบันทึกผล

6.9.3.1 บันทึกผลเช่นเดียวกับการทดลองที่ 8

ชิ้นส่วนพืชที่ใช้ในการทดลองที่ 1 - 9 ได้จากการใช้ข้อของกิ่งอ่อนส้มโอ จากต้นพันธุ์ในแปลง (อธิบายไว้ในข้อ 3) ยกเว้นการทดลองที่ 3 ข้อ 6.3.1 ซึ่งใช้ยอดใหม่ที่ได้จากการเลี้ยงข้อส้มโอในสภาพปลอดเชื้อ

สภาพแสงและอุณหภูมิที่ใช้ในทุกการทดลองเหมือนกัน โดยนำหลอดทดลองเสียบในตะแกรงเหล็กวางบนชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่ติดหลอดฟลูออเรสเซนซ์ชั้นละ 4 หลอด เหนือชั้น ระยะห่างจากหลอดไฟถึงชั้นวางประมาณ 45 ซม และความเข้มแสงที่ระดับชิ้นส่วนพืชประมาณ 1,700 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชม/ว อุณหภูมิห้องที่เลี้ยงชิ้นส่วนพืชทดลองเฉลี่ย 28 $\pm$2 °ซ ตลอดกลางวันและกลางคืน

การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา ทำโดยการแช่แข็งเนื้อเยื่อในน้ำยา Tissue - Tek ที่ -20 °C และตัดฝานเนื้อเยื่อด้วย freezing microtome ให้เนื้อเยื่อมีความหนา 20 ไมโครเมตร

การวัดปริมาณก๊าซ โดยการใช้เข็มฉีดยาขนาด 1 มล ดูดอากาศภายในหลอด 1 มล ไปฉีดสู่คอลัมภ์วัดก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ และใช้เข็มขนาด 2.5 มล ดูดอากาศภายในหลอด 2 มล ไปฉีดสู่เครื่องวัดก๊าซเอทธิลีนของเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟฟี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved