บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

1. วัสดุ และอุปกรณ์

1.1 ยอดปอสาที่มีความสูงประมาณ 0.5 ซม. และมีจำนวนข้อ 2 ข้อต่อยอด (ภาพที่ 1)

1.2 ตู้กรองอากาศบริสุทธิ์

1.3 ตะแกรงเหล็กใส่หลอดแก้ว

1.4 ชั้นสำหรับวางตะแกรง

1.5 เครื่องชั่งชนิดละเอียด (analytical balance)

1.6 เครื่องชั่งไฟฟ้า (electrical balance) ชั่งได้ถึง 0.1 มก

1.7 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง

1.8 เตาไฟฟ้า

1.9 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ

1.10 เครื่องตัดเนื้อเยื่อ (rotary microtome)

1.11 กล้องจุลทรรศน์

1.12 กล้องถ่ายรูป

1.13 เครื่องวัดก๊าซ (gas chromatographer)

1.14 หลอดทดลองขนาด 25 x 150มม

1.15 ขวดทดลองขนาด 90 x 140 มม

1.16 เครื่องแก้วอื่น ๆ เช่น บิกเกอร์ กระบอกวัดปริมาณ ปิเปต ขวดวัดปริมาตร กรวยแก้ว ขวดใส่สารละลายเข้มข้น จานเลี้ยงเชื้อ แท่งแก้วคน เข็มฉีดยา แผ่นสไลด์ กระจกปิดสไลด์ ฯลฯ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.17 วัสดุที่ใช้ในตู้กรองอากาศ ได้แก่ ตะเกียงแอลกอฮอล์ ปากคีบ ขนาดยาว 140 และ 180 มม ด้ามมีดเบอร์ 3 ใบมีดเบอร์ 10 และ 11 แท่งทองเหลืองสำหรับวางด้ามมีดและปากคีบ กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 3 แผ่นพลาสติกใสขนาด 70 X 90 มม หลอดทดลองใส่แอลกอฮอล์ขนาด 25 x 150 มม จานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 100 และ 150 มม ฯลฯ

1.18 วัสดุอื่น ๆ เช่น ช้อนตักสาร แผ่นพลาสติกใส ฝาโลหะสำหรับปิดขวดทดลอง ยางรัดของ กระดาษกาวเขียนกรรมวิธีติดหลอดทดลอง ฟิล์มถ่ายรูป ฯลฯ

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับฆ่าเชื้อ

2.1.1 เอทธิลแอลกอฮอล์ เข้มข้น 70 % สำหรับใช้ฆ่าเชื้อในตู้กรองอากาศ

2.2 สารที่ใช้สำหรับเตรียมอาหาร

2.2.1 เกลือให้ธาตุอาหารหลักต่าง ๆ ตามสูตร Schenk and Hildebrandt (SH) (1972)

2.2.2 เกลือให้ธาตุอาหารรองต่าง ๆ ตามสูตร Murashige and Skoog (MS) (1962)

2.2.3 วิตามินต่าง ๆ และสารอินทรีย์ ตามสูตร MS (1962) และวิตามิน B2 (Riboflavin)

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.5 Ethylene diamine tetraaectic acid diNa-Salt dihydrate ของ บริษัท Koch-Light Laboratories Ltd., England

2.2.6 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

2.2.6.1 Benzyl amino purine (BAP) ของบริษัท Sigma Chemical CO., U.S.A.

2.2.6.2 6-Furfuryl amino purine (Kinetin) ของบริษัท E.Merck Dramstadt, West Germany

2.2.6.3 Indole-3-butyric acid (IBA) ของบริษัท E.Merck, Dramstadt, West Germany

2.2.7 Potassium hydroxide (KOH) 1 N

2.2.8 Hydrochloric (HCL) 1 N

2.2.9 น้ำกลั่นที่กลั่นจากเครื่องแก้ว

2.2.10 ผงวุ้นตราเฮลิคอปเตอร์

2.2.11 น้ำตาลซูโครส

2.3 สารที่ใช้ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

2.3.1 เอทธิลแอลกอฮอล์ บริสุทธิ์

2.3.2 เอทธิลแอลกอฮอล์ 95 %

2.3.3 แอมโมเนียมอลูมิเนียมซัลเฟต

2.3.4 ฟอร์มาลิน

2.3.5 กรดกลาเซียลอะซิติก

2.3.6 พาราฟิน

2.3.7 กลีเซอรีน

2.3.8 ไซลอล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.9 เทอเทียรีบิวธิลแอลกอฮอล์ (tertiary butyl alcohol)

2.3.10 แคนาดาบาลซัม (Canada balsam)

2.3.11 สีฮีมาทอกไซลิน (hematoxylin)

2.3.12 สีอีริทโทรซิน (Erythrosin)

3. การเตรียมพืชทดลอง

ใช้ยอดพันธุ์ปอสา เบอร์ 589 ที่ได้จากการเลี้ยงปลายยอดบนอาหารวุ้น สูตร T17 (Apavatjrut et al.,1987) (ตารางที่ 5) ที่ประกอบด้วยธาตุอาหารหลัก สูตร SH (1972) ธาตุอาหารรอง วิตามิน และธาตุเหล็ก สูตร MS (1962) + BAP 1.125 มก/ล + IBA 0.25 มก/ล น้ำตาล 30 มก/ล และวุ้น 10 ก/ล โดยเลือกต้นที่มีความสม่ำเสมอกันและสูงประมาณ 0.5 ซม. มีจำนวนข้อ 2 ข้อต่อยอด และมีใบ 3 ใบ

ภาพที่ 1 ลักษณะของยอดปอสาที่ใช้เป็นชิ้นส่วนในการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution)

4.1 การเตรียมธาตุอาหารหลัก

เตรียมธาตุอาหารหลักที่ใช้ในสูตร SH (1972) โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน โดยให้มีความเข้มข้นของสารเป็น 10X ของสารละลายมาตรฐาน เตรียมให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล โดยใช้ปริมาณสารดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชนิดและปริมาณสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร SH (1972)

ชนิดสาร	ปริมาตรสารในสูตร SH (1972) (ก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาเข้มข้น 10X (ก/ล)
KNO_3	2.5	25
$MgSO_4 . 7H_2O$	0.4	4
$(NH_4)H_2PO_4$	0.3	3
$CaCl_2 . 2H_2O$	0.2	2

4.2 การเตรียมธาตุอาหารรอง

เตรียมธาตุอาหารรองสูตร MS (1962) โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน โดยให้ความเข้มข้นของสารเป็น 100X ของสารละลายมาตรฐาน เตรียมให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล (ตารางที่ 2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 ชนิดและปริมาณของสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรองสูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาเข้มข้น 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
$Na_2MoO_4 . 2H_2O$	0.250	25.0
$CoCl_2 . 6H_2O$	0.025	2.5

4.3 การเตรียมวิตามิน

4.3.1 เตรียมวิตามินสูตร MS (1962) ดัดแปลง โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน โดยให้ความเข้มข้นของสารเป็น 100X ของความเข้มข้นมาตรฐาน เตรียมให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล (ตารางที่ 3)

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	2.0	200
myo-inositol	100.0	10,000
thiamine.HCl	0.1	10
pyridoxine.HCl	0.5	50
nicotinic acid	0.5	50

4.3.2 การเตรียมวิตามิน B2 (Riboflavin)

ชั่งวิตามิน B2 100 มก ละลายด้วยสารละลาย 1 N KOH เล็กน้อย แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น การละลายของสารทำในสภาพที่มีแสงน้อยที่สุด แล้วนำไปเก็บไว้ในที่มืด โดยการหุ้มขวดด้วยกระดาษอลูมินั่มให้มิดชิดเพื่อป้องกันแสง สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริง ดูรายละเอียดจากแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในการทดลอง

4.4 การเตรียมสารละลายเหล็กในรูป Fe EDTA

เตรียม Fe EDTA ในสูตร MS (1962) ซึ่งประกอบไปด้วย $FeSO_4 . 7H_2O$ และ $Na_2EDTA.2H_2O$ โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน ปริมาณสารเข้มข้นเป็น 100X โดยชั่งสารแต่ละชนิดตามที่กำหนด (ตารางที่ 4) ละลายในน้ำให้มีปริมาตรสุดท้ายของแต่ละส่วน 500 มล แล้วนำมารวมกัน การละลายของสารทำในสภาพที่มีแสงน้อยที่สุด แล้วนำสารละลายทั้งสองมาผสมรวมไว้ในขวดเดียวกัน และเก็บสารละลายในที่มืดโดยการหุ้มขวดด้วยกระดาษอลูมินั่มให้มิดชิดเพื่อป้องกันแสง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4 ชนิดและปริมาณของสารละลายเหล็กเข้มข้นสูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาเข้มข้น 100 x (มก/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

4.5.1.1 ชั่ง BAP 10 มก ละลายด้วยสารละลาย 1 N KOH เล็กน้อยสำหรับให้ละลายให้หมด แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริง ดูรายละเอียดแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในกรรมวิธีการทดลอง

4.5.1.2 ชั่ง BAP 50 มก ละลายด้วยสารละลาย 1 N KOH เล็กน้อยสำหรับให้ละลายให้หมด แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 50 มล ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริง ดูรายละเอียดแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในกรรมวิธีการทดลอง

4.5.2 การเตรียม KIN

4.5.2.1 ชั่ง KIN 10 มก ละลายด้วยสารละลาย 1 N HCl เล็กน้อย แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริง ดูรายละเอียดจากแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในการทดลอง

4.5.2.2 ชั่ง KIN 50 มก ละลายด้วยสารละลาย 1 N HCl เล็กน้อย แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 50 มล ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริง ดูรายละเอียดจากแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.5.3 การเตรียม IBA

ชั่ง IBA 10 มก ละลายด้วยสารละลาย 1 N KOH เล็กน้อย แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นที่จริง ดูรายละเอียดจากแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในการทดลอง

5. การเตรียมอาหารพื้นฐานสูตร T17

ใส่น้ำกลั่นลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 1,000 มล ประมาณ 1/3 ของขวด แล้วเติมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักลงไป (ตารางที่ 5 หน้า 21) เขย่าน้ำยาในขวดให้เข้ากันดี หลังจากนั้นก็เติมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรอง วิตามิน เหล็ก และสารควบคุมการเจริญเติบโตลงไป ตามลำดับ แล้วเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปอีกจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล เทสารละลายลงในบิกเกอร์ขนาด 2,000 มล นำไปปรับค่าความเป็นกรดให้ได้ 5.7 โดยใช้ 1 N HCl และ 1 N KOH แล้วเติมน้ำตาลซูโครส และวุ้นลงไป คนให้ละลาย นำไปต้มให้วุ้นละลายสุกก่อน ตวงแบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 25 x 150 มม หลอดละ 10 มล ปิดหุ้มหลอดทดลองด้วยแผ่นพลาสติกใสทนความร้อนขนาด 70 x 90 มม รัดด้วยยางรัดของ และรัดรวมกัน 5 หลอด แล้วหุ้มด้วยกระดาษลอกลายขนาด 120 x 120 มม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่ 15 ป/ตรน นาน 15 น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบของสารละลายเข้มข้นแต่ละชนิดในอาหารพื้นฐานสูตร T17

ชนิดของสารละลาย	ปริมาณสารละลายเข้มข้นในอาหาร (มล/ล)
ธาตุอาหารหลักสูตร SH (1972) ความเข้ม 10 x	100
ธาตุอาหารรอง เหล็ก และวิตามิน สูตร MS (1962) ความเข้มข้นชนิดละ 100X	
ธาตุอาหารรอง	10
เหล็ก	10
วิตามิน	10
สารควบคุมการเจริญเติบโต	
BAP (50 มก/50 มล)	1.125 (1.125 มก/ล)
IBA (10 มก/100 มล)	2.5 (0.25 มก/ล)
น้ำตาลซูโครส	30,000 มก
วุ้น	10,000 มก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. วิธีการวิจัย

การศึกษาแบ่งออกเป็น 3 หัวข้อ คือ

1. ศึกษาผลของส่วนประกอบของอาหารที่มีต่อการเพิ่มปริมาณและคุณภาพของปอสา

6.1 การทดลองที่ 1 ผลของ riboflavin และปริมาณวุ้นที่มีต่อการเพิ่มปริมาณ และคุณภาพของปอสา

6.1.1 พืชทดลอง

ดูวิธีการเตรียมพืชทดลอง ในข้อ 3

6.1.2 อาหารที่ใช้เลี้ยง

ใช้อาหารพื้นฐานสูตร T17 แต่มีการเพิ่มวิตามิน riboflavin และปรับปริมาณวุ้น โดยที่ riboflavin ใช้ระดับความเข้มข้น 0 และ 2 มก/ล ส่วนปริมาณวุ้น ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0-12 ก/ล ในการเตรียมอาหารวุ้นทำเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารพื้นฐานสูตร T17 ในกรณีอาหารเหลว จะใส่กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ซึ่งนำมาพับครึ่งและพับอีกครึ่งหนึ่ง แล้วหักพับเป็นรูปตัว M สำหรับวางชิ้นส่วนพืช ใช้ภาชนะและปริมาตรต่อหลอดทดลองเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารพื้นฐานสูตร T17

6.1.3 วิธีการทดลอง

กำหนดปัจจัยและระดับความเข้มข้นที่ทดลองดังนี้

1. riboflavin แบ่งเป็น 2 ระดับ คือ 0 และ 2 มก/ล
2. วุ้น แบ่งเป็น 5 ระดับ คือ 0 6 8 10 และ 12 ก/ล

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) โดยมี 2 ปัจจัย คือ riboflavin 2 ระดับ และวุ้น 5 ระดับ รวมเป็น 10 กรรมวิธี โดยทดลอง 10 ซ้ำ ในแต่ละกรรมวิธี (ตารางที่ 6)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 6 แสดงกรรมวิธีในการทดลองที่ 1

ปริมาณวุ้น (ก/ล) \ riboflavin (มก/ล)	0	2
0	กรรมวิธี 1	6
6	2	7
8	3	8
10	4	9
12	5	10

6.1.4 การบันทึกผล

ทำการบันทึกผลการทดลองทุกสัปดาห์ ติดต่อกันนาน 4 สัปดาห์ ดังนี้

6.1.4.1 วัดความสูงของต้น โดยวัดจากโคนต้นบริเวณรอยตัดจนถึงข้อสุดท้ายที่บริเวณโคนใบบรรจบกันที่ติดกับยอด

6.1.4.2 จำนวนต้นและเปอร์เซ็นต์การแตกตาข้าง เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

6.1.4.3 เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสหรือราก

6.1.4.4 เปอร์เซ็นต์ใบหรือยอดเสียหาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.1.4.5 เปอร์เซ็นต์ใบร่วง

6.1.4.6 บันทึกทางด้านคุณภาพ คือ การฉ่ำน้ำ และสีของใบ

- บันทึกระดับการฉ่ำน้ำของใบ โดยดูด้วยสายตาแล้วให้ระดับคะแนนดังนี้

0 = ไม่ฉ่ำน้ำ

1 = ฉ่ำน้ำเล็กน้อย

2 = ฉ่ำน้ำปานกลาง

3 = ฉ่ำน้ำมาก

4 = ฉ่ำน้ำมากที่สุด

- บันทึกระดับสีของใบ โดยดูด้วยสายตาแล้วให้ระดับคะแนนดังนี้

1 = สีเขียวออกเหลือง

2 = สีเขียวอ่อน

3 = สีเขียว

4 = สีเขียวเข้ม

5 = สีเขียวเข้มมาก (ใบมันเหมือนใบที่ได้จากการปลูกในธรรมชาติ)

6.1.4.7 ศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

6.2 การทดลองที่ 2 ผลของ BAP และ IBA ที่มีต่อการเพิ่มปริมาณและคุณภาพของปอสา

6.2.1 พืชทดลอง

เหมือนการทดลองที่ 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.2.2 อาหาร

ใช้อาหารพื้นฐานสูตร T17 แต่มีการเพิ่ม riboflavin ความเข้มข้น 2 มก/ล และใช้ปริมาณวุ้น 8 ก/ล แต่มีการปรับระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ BAP และ IBA โดยปรับระดับของ BAP อยู่ในช่วง 1-4 มก/ล ส่วน IBA ให้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.03-3 มก/ล ใช้ภาชนะและอาหารต่อหลอดทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

6.2.3 วิธีการทดลอง

กำหนดปัจจัยและความเข้มข้นที่ทดลอง ดังนี้

1. BAP แบ่งเป็น 3 ระดับ คือ 1 2 และ 4 มก/ล

2. IBA แบ่งเป็น 3 ระดับ คือ 0.03 0.3 และ 3 มก/ล

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยมี 2 ปัจจัย คือ BAP 3 ระดับ และ IBA 3 ระดับ รวมเป็น 9 กรรมวิธี โดยทดลอง 10 ซ้ำ ในแต่ละกรรมวิธี (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 แสดงกรรมวิธีในการทดลองที่ 2

IBA (มก/ล) \ BAP (มก/ล)	1	2	4
0.03	กรรมวิธี 1	4	7
0.3	2	5	8
3	3	6	9

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.2.4 การบันทึกผล

ทำเหมือนการทดลองที่ 1 แต่มีการนับจำนวนข้อเมื่อสิ้นสุดการทดลอง และวัดหาปริมาณก๊าซเอทธิลีน คาร์บอนไดออกไซด์ และออกซิเจน ด้วยเครื่องวัดก๊าซโครมาโตกราฟ หลังจากเลี้ยงครบ 1 วัน และทุก ๆ วันจนครบ 7 วัน และหลังจากนั้นวัดเมื่อครบ 10 และ 13 วัน

6.3 การทดลองที่ 3 ผลของ KIN และ IBA ที่มีต่อการเพิ่มปริมาณและคุณภาพของปอสา

6.3.1 พืชทดลอง

เหมือนการทดลองที่ 1

6.3.2 อาหารที่ใช้เลี้ยง

ใช้อาหารวุ้นเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 แต่มีการเปลี่ยน KIN แทน BAP โดยใช้ที่ระดับความเข้มข้น อยู่ในช่วง 1-8 มก/ล ส่วน IBA ใช้เหมือนการทดลองที่ 2 คือ อยู่ในช่วง 0.03-3 มก/ล ใช้ภาชนะและอาหารต่อหลอดทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

6.3.3 วิธีการทดลอง

กำหนดปัจจัยและความเข้มข้นที่ทดลอง ดังนี้

1. KIN แบ่งเป็น 4 ระดับ คือ 1 2 4 และ 8 มก/ล
2. IBA แบ่งเป็น 3 ระดับ คือ 0.03 0.3 และ 3 มก/ล

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมสุ่มสมบูรณ์ โดยมี 2 ปัจจัย คือ KIN 4 ระดับ และ IBA 3 ระดับ รวมเป็น 12 กรรมวิธี โดยทดลอง 10 ซ้ำ ในแต่ละกรรมวิธี (ตารางที่ 8)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 8 แสดงกรรมวิธีในการทดลองที่ 3

IBA (มก/ล) \ KIN (มก/ล)	1	2	4	8
0.03	กรรมวิธี 1	4	7	10
0.3	2	5	8	11
3	3	6	9	12

6.3.4 การบันทึกผล

เหมือนการทดลองที่ 1 แต่มีการนับจำนวนข้อเมื่อสิ้นสุดการทดลอง และวัดหาปริมาณก๊าซเอทธิลีน คาร์บอนไดออกไซด์ และออกซิเจน หลังจากเลี้ยงครบ 1 วัน และทุก ๆ วัน จนครบ 7 วัน และหลังจากนั้นวัดเมื่อครบ 10 และ 13 วัน

II. ศึกษาพันธุ์และภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยงต่อปริมาณและคุณภาพของปอสา

6.4 การทดลองที่ 4 การศึกษาเปรียบเทียบพันธุ์ปอสา

6.4.1 พืชทดลอง

เหมือนการทดลองที่ 1 แต่มีการเพิ่มปอสาพันธุ์เบอร์ 710 อีกหนึ่งพันธุ์ ซึ่งวิธีการเตรียมพืชทดลอง เหมือนปอสาพันธุ์ เบอร์ 589 (ดูข้อ 3 หน้า 15)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.4.2 อาหาร

ใช้อาหารพื้นฐานเช่นเดียวกับอาหารสำหรับการทดลองที่ 1 แต่มี riboflavin 2 มก/ล และปริมาณวุ้น 8 ก/ล

6.4.3 วิธีการทดลอง

กำหนดพันธุ์ที่ใช้ทดลอง 2 พันธุ์ คือ

1. ปอสาพันธุ์ เบอร์ 589

2. ปอสาพันธุ์ เบอร์ 710

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ รวม 2 กรรมวิธี โดยทดลอง 5 ซ้ำ ในแต่ละกรรมวิธี

6.4.4 การบันทึกผล

วัดหาปริมาณก๊าซเอทธิลีน คาร์บอนไดออกไซด์ และออกซิเจน หลังจากเลี้ยงครบ 1 วัน และทุก ๆ วัน จนครบ 7 วัน และหลังจากนั้นวัดเมื่อครบ 10 และ 13 วัน

6.5 การทดลองที่ 5 การเปรียบเทียบภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยง

6.5.1 พืชทดลอง

เหมือนการทดลองที่ 1

6.5.2 อาหารที่ใช้เลี้ยง

ใช้อาหารสูตรเดียวกันกับการทดลองที่ 4

6.5.3 วิธีการทดลอง

กำหนดภาชนะที่ใช้ทดลอง 2 ชนิด คือ

1. หลอดทดลองขนาด 25 x 150 มม

2. ขวดแก้วขนาด 90 x 140 มม

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ รวม 2 กรรมวิธี โดยทดลอง 5 ซ้ำ ในแต่ละกรรมวิธี

6.5.4 การบันทึกผล

ทำการบันทึกเช่นเดียวกับการทดลองที่ 4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

III. ศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

6.6 การทดลองที่ 6 การตรวจสอบโครงสร้างภายในใบของต้นที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเปรียบเทียบกับใบในสภาพธรรมชาติ

6.6.1 พืชทดลอง

เริ่มต้นเหมือนการทดลองที่ 1 เพื่อผลิตพืชจากการเลี้ยงบนอาหารที่มีชนิดและระดับของไซโตไคนินในอาหารที่เลี้ยงต่างกัน (ดูวิธีการทดลองข้อ 6.6.3)

6.6.2 อาหาร

ใช้อาหารวุ้นเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 แต่มี IBA 0.3 มก/ล และมีชนิดและระดับของไซโตไคนินในอาหารที่เลี้ยงต่างกัน (ดูวิธีการทดลอง ข้อ 6.6.3)

6.6.3 วิธีการทดลอง

ทำการศึกษาใบของต้นที่เลี้ยงบนอาหารที่มีชนิดและระดับของไซโตไคนินในอาหารที่เลี้ยงต่างกัน เปรียบเทียบกับใบที่ได้จากต้นที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ โดยกำหนดสภาพอาหารที่ใช้เลี้ยงดังนี้

1. ใบที่ได้จากการเลี้ยงบนอาหารวุ้นที่ประกอบด้วย BAP 1 มก/ล แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหาร ที่มี BAP 1 มก/ล เท่าเดิมหลังจากเลี้ยงบนอาหารชุดแรกแล้วนาน 4 สัปดาห์

2. ใบที่ได้จากการเลี้ยงบนอาหารวุ้นที่ประกอบด้วย BAP 3 มก/ล แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหาร ที่มี BAP 3 มก/ล เท่าเดิมหลังจากเลี้ยงบนอาหารชุดแรกแล้วนาน 4 สัปดาห์

3. ใบที่ได้จากการเลี้ยงบนอาหารวุ้นที่ประกอบด้วย BAP 3 มก/ล แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหาร ที่มี BAP 0.3 มก/ล หลังจากเลี้ยงบนอาหารชุดแรกแล้วนาน 4 สัปดาห์

4. ใบที่ได้จากการเลี้ยงบนอาหารวุ้นที่ประกอบด้วย BAP 3 มก/ล แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหาร ที่มี KIN 3 มก/ล เท่าเดิมหลังจากเลี้ยงบนอาหารชุดแรกแล้วนาน 4 สัปดาห์

5. ใบที่ได้จากการปลูกในธรรมชาติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สภาพแสงและอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองเหมือนกัน โดยนำหลอดทดลองเสียบลงในตะแกรงเหล็ก หรือนำขวดทดลองไปวางไว้บนชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่ติดหลอดฟลูออเรสเซนต์ชั้นละ 3 หลอด ความเข้มแสงที่ระดับชิ้นส่วนพืชประมาณ 1,700 ลักซ์ ให้แสงเป็นเวลา 16 ชม/ว อุณหภูมิห้องที่เลี้ยงชิ้นส่วนพืชทดลองเฉลี่ย 28 $\pm$ 2 $^{\circ}$ซ ตลอดกลางวันและกลางคืน

การวัดปริมาณก๊าซ ทำได้โดยการใช้เข็มฉีดยาขนาด 1 มล ดูดอากาศภายในหลอดทดลองหรือขวดทดลอง 1 มล ไปฉีดลงสู่คอลัมน์ วัดก๊าซออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ และใช้เข็มฉีดยาขนาด 1 มล ดูดอากาศภายในหลอดทดลองหรือขวดทดลอง 1 มล ไปฉีดลงสู่เครื่องวัดก๊าซเอทธิลีน ของเครื่องโครมาโตรกราฟ

7. การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

นำชิ้นส่วนของพืชที่ต้องการศึกษามาทำการฆ่าและรักษาสภาพเซลล์ด้วยน้ำยา FAA (Formalin-Acetic-Alcohol) ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมของ เอทธิลแอลกอฮอล์ (95 %) กรดกลาเซียลอะซิติก 5 มล, ฟอร์มาลิน (37-41 %) 10 มล และน้ำกลั่น 35 มล จากนั้นทำการดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยใช้ส่วนผสมของ น้ำกลั่น เอทธิลแอลกอฮอล์ (95 %) เทอเทียรีบิวธิลแอลกอฮอล์ (TBA) และ เอทธิลแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ โดยผสมไว้เป็นอัตราส่วนต่างกัน 5 ระดับ ตามรายละเอียดข้างล่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อัตราส่วนของสารเคมีที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์

ระดับ	น้ำกลั่น (มล)	เอทธิลแอลกอฮอล์ (95 %) (มล)	TBA (มล)	เอทธิลแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (มล)
50	50	40	10	-
70	30	50	20	-
85	15	50	35	-
95	-	45	55	-
100	-	-	75	25

ในการดึงน้ำออกจากเซลล์ทั้ง 5 ระดับนี้ ใช้เวลาช่วงละ 12 ชั่วโมง โดยที่ระยะที่ 5 นี้ มีการใช้สีอีริทโทรซินร่วมด้วย เมื่อครบทั้ง 5 ระดับแล้วจะใช้ TBA บริสุทธิ์อีก 3 ครั้ง ครั้งละ 12 ชม หลังจากนั้นทำให้พาราฟินแทรกซึมเข้าเนื้อเยื่อโดยใช้ส่วนผสมของ TBA และ พาราฟินออยล์ อัตราส่วน 1 : 1 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม หลังจากนั้นเก็บไว้ใน พาราพลาสต์ที่ผสมไว้ล่วงหน้า แล้วนำไปวางไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 56-58°ซ ประมาณ 2 สัปดาห์ แล้วจึงทำการฝังชิ้นส่วนที่จะศึกษาดังกล่าวลงในพาราพลาสต์ที่เตรียมไว้ เก็บไว้ในตู้เย็นประมาณ 24 ชม นำชิ้นส่วนไปฝานเป็นชิ้นบางด้วยเครื่องฝานเนื้อเยื่อ แบบใช้มือหมุน (Rotary microtome) ติดแผ่นเนื้อเยื่อบนแผ่นสไลด์ด้วยน้ำยาติดเนื้อเยื่อคือ อัลบูมีน วางสไลด์บน hot plate ที่อุณหภูมิ 40 °ซ เมื่อเนื้อเยื่อติดแผ่นสไลด์ดีแล้ว นำมาย้อมสีเนื้อเยื่อด้วย Delafield's hematoxylin เป็นเวลา 5 นาที ทำความสะอาดสไลด์ แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ โดยอาศัยตัวกลางสำหรับยึดปิดแผ่นสไลด์ด้วยแคนาดาบาลซัม เมื่อสไลด์แห้ง ทำการศึกษาเปรียบเทียบจากกล้องจุลทรรศน์และทำการบันทึกภาพ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง (Olympus OM-1)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved