บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 ต้นพืชทดลอง คือ ต้นอ่อนของหงส์เหินดอกขาว (*Globba winitii* Wright) ที่ได้จากการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ
1.2 ตู้กรองอากาศบริสุทธิ์ (laminar air flow)
1.3 ชั้นสำหรับวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีความเข้มแสง 2,000 ลักซ์
1.4 กล้องจุลทรรศน์ (dissecting microscope)
1.5 เครื่องชั่งชนิดละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง
1.6 เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 3 ตำแหน่ง (electrical balance)
1.7 ตะแกรงสำหรับวางหลอดที่เลี้ยงเนื้อเยื่อ ขนาด 40 หลอด
1.7 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
1.8 หม้อนึ่งความดันไอ
1.10 เตาไมโครเวฟ
1.11 ขวดปรับปริมาตร ขนาด 100, 500 และ 1,000 มล
1.12 หลอดทดลองขนาด 25 x 150 มม
1.13 ขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ
1.14 ปิเปต ขนาด 1, 2, 5 และ 10 มล
1.15 บีกเกอร์ขนาด 10, 50, 100, 1,000 และ 2,000 มล
1.16 กระบอกวัดปริมาตรขนาด 10, 50 และ 100 มล
1.17 แท่งแก้วสำหรับคนสาร
1.18 จานเลี้ยงเชื้อ (petri-dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 95 และ 140 มม
1.19 ช้อนตักสาร
1.20 ขวดใส่สารละลายเข้มข้น ปริมาตร 1,000 มล
1.21 วัสดุที่ใช้ในตู้กรองอากาศ ได้แก่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Copyright by Chiang Mai University

1.21.1 ด้ามมีดผ่าตัดเบอร์ 3

1.21.2 ใบมีดผ่าตัดเบอร์ 10 และ 11

1.21.3 ด้ามมีดเข็มเขี่ย

1.21.4 ใบมีดโกนที่ตัดเป็นใบมีดเล็กขนาด 2 x 10 มม

1.21.5 ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.21.6 ปากคีบ (forcep) ขนาดยาว 140 และ 180 มม

1.21.7 แผ่นพลาสติกตัดเป็นแผ่นสี่เหลี่ยมขนาด 70 x 90 มม

1.21.8 หลอดทดลองขนาด 25 x 150 มม สำหรับใส่แอลกอฮอล์

1.22 วัสดุอื่นๆ เช่น แผ่นอลูมินัม (aluminum foil) ยางรัดของ แผ่นป้าย (label) ฯลฯ

1.23 น้ำกลั่นซึ่งกลั่นจากเครื่องแก้ว

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับฆ่าเชื้อ

2.1.1 Ethanol ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์

2.2.2 คลอร็อกซ์ (Chlorox) ของบริษัท The Clorox Co. , USA

2.2 สารเคมีใช้สำหรับเตรียมอาหาร

2.2.1 เกลือให้ธาตุอาหารหลักต่างๆ ตามสูตร MS

2.2.2 เกลือให้ธาตุอาหารรองต่างๆ ตามสูตร MS

2.2.3 วิตามินต่างๆ ตามสูตร MS

2.2.4 สารละลายเหล็กความเข้มข้น ตามสูตร MS

2.2.5 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

2.2.5.1 Napthalene acetic acid (NAA) ของบริษัท Sigma Chemical Co. , USA

2.2.5.2 6-Benzyl aminopurine (BAP) ของบริษัท Sigma Chemical Co. , USA

2.2.5.3 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) ของบริษัทSigma Chemical Co. , USA.

2.2.6 Potassium hydroxide (KOH) 1 M

2.2.7 Hydrochloric acid (HCl) 1 M

2.2.8 น้ำกลั่น

2.2.9 ผงวุ้น ตราเฮลิคอปเตอร์

2.3 สารที่ใช้ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

2.3.1 Ethanol 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 Haematoxylin

2.3.11 น้ำยา Canada balsum

3. พืชทดลอง

3.1 ต้นอ่อน (plantlet)

การศึกษาในครั้งนี้ใช้หงส์เหินดอกขาวเป็นพืชทดลอง (ภาพ 4) ต้นพืชทดลองที่ใช้ในการศึกษานี้ใช้ต้นอ่อนอายุ 2 เดือนจากการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อโดยนำชิ้นส่วนรอยต่อระหว่างรากกับลำต้น ขนาด 0.5 ซม แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BAP ความเข้มข้น 1.0 มก/ล ภายใต้สภาพอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ได้รับแสงความเข้ม 2,000 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน ชิ้นส่วนนี้ต่อมามีการเจริญพัฒนาให้ต้นอ่อนจำนวนหนึ่งซึ่งสามารถจึงนำไปใช้ในการทดลองได้ โดยตัดส่วนรอยต่อระหว่างรากกับลำต้นของต้นอ่อนไปเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆและตามกรรมวิธีต่างๆ ต่อไป

3.2 ช่อดอกอ่อนจากต้นหงส์เหินในสภาพธรรมชาติ

นำส่วนช่อดอกอ่อนที่หุ้มด้วยกาบใบ มาทำความสะอาดโดยเช็ดด้วยethanol ความเข้มข้น70 เปอร์เซ็นต์ และตามด้วยคลอร๊อกซ์ ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เขย่านาน 15 นาที ล้างในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง แล้วลอกกาบใบที่หุ้มช่อดอกอ่อนออก เลือกขนาดตามที่ระบุไว้เพื่อใช้ในการทดลองที่ 3.1 ต่อไป

ภาพ 4 ต้นหงส์เหินในสภาพปลอดเชื้อ อายุ 2 เดือน

4. การเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution)

4.1 การเตรียมธาตุอาหารหลัก

เตรียมธาตุอาหารหลักที่ใช้ในสูตร MS ความเข้มข้น 10X โดยชั่งสารแต่ละชนิดในตาราง 1 ละลายสารทีละชนิดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 1,000 มล แล้วเทใส่ขวดเก็บสารละลายเข้มข้นทุกชนิดรวมกัน ปิดฝา เก็บในตู้เย็น

ตาราง 1 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร MS

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาความเข้มข้น 10X (ก/ล)
NH_4NO_3	1,650	16.50
KNO_3	1,900	19.00
$CaCl_2 .2H_2O$	44	4.40
$MgSO_4 .7H_2O$	370	3.70
KH_2PO_4	170	1.70

4.2 การเตรียมธาตุอาหารรอง

เตรียมธาตุรองสูตร MS ดัดแปลง โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน โดยให้ความเข้มข้นของสารมากกว่าที่ใช้จริง 100X เตรียมน้ำยาให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล (ตาราง 2)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตาราง 2 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรองสูตร MS

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาเข้มข้น 100X (มก/ล)
$CuSO_4 .5H_2O$	0.025	2.5
KI	0.83	83.0
$ZnSO_4 .7H_2O$	8.60	860.0
$MnSO_4 .4H_2O$	22.30	2,230.0
H_3BO_4	6.20	620.0
$Na_2MoO_4 .2H_2O$	0.25	25.0
$CaCl_2 .6H_2O$	0.025	2.5

4.3 การเตรียมสารประกอบอินทรีย์สูตร MS

การเตรียมวิตามินสูตร MS โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน ความเข้มข้นของสารมากกว่าที่ใช้จริง 100X เตรียมน้ำยาให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล (ตาราง 3)

ตาราง 3 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของสารประกอบอินทรีย์สูตร MS

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาเข้มข้น 100X (มก/ล)
Glycine	200.00	200
Thiamine .HCl	0.25	25
Pyridoxine .HCl	0.25	25
Nicotinic acid	0.25	25
Myo-inositol	100.00	10,000

4.4 การเตรียมสารละลายเหล็กเข้มข้น

เตรียม FeEDTA สูตร MS ซึ่งประกอบด้วย $FeSO_4 .7H_2O$ และ $Na_2EDTA .2H_2O$ โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน ความเข้มข้นของสารมากกว่าที่ใช้จริง 100X เตรียมน้ำยาให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล ทำการเตรียมโดยชั่งสารแต่ละชนิดละลายน้ำให้มีปริมาตรสุดท้ายของแต่ละส่วนเป็น 500 มล (ตาราง 4) แล้วจึงนำมาผสมไว้ในขวดเดียวกัน โดยใช้ขวดสีชาเพื่อป้องกันแสง

ตาราง 4 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของเหล็กสูตร MS

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาเข้มข้น 100X (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 NAA

ชั่ง NAA 10 มก ละลายด้วย absolute ethanol เล็กน้อยเพียงพอให้ละลายได้ แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายของแต่ละความเข้มข้นให้เป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริงดูรายละเอียดจากแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในแต่ละการทดลอง

4.5.2 การเตรียม 2,4-D

ชั่ง 2,4-D 10 มก ละลายด้วย absolute ethanol เล็กน้อยเช่นเดียวกับการ เตรียม NAA แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริงดูรายละเอียดจากแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในแต่ละการทดลอง

4.5.3 การเตรียม BAP

ชั่ง BAP 10 มก ละลายด้วยสารละลาย 1 N KOH เล็กน้อยเพียงพอให้สารละลายได้แล้ว ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริงดูรายละเอียดจากแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในแต่ละการทดลอง

5. การเตรียมอาหารพื้นฐานสูตร MS ดัดแปลง

นำส่วนประกอบของอาหารพื้นฐานสูตร MS จากน้ำยาเข้มข้นที่เตรียมในข้อ 4 มาผสมให้เข้ากัน โดยใช้สารละลายเข้มข้นแต่ละชนิดดังแสดงในตาราง 5

ขั้นตอนการทำอาหารสูตร MS ดัดแปลงทำดังนี้

ใส่น้ำกลั่นลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มล ประมาณ 1/3 ของขวดแล้วเติมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักลงไป หลังจากนั้นจึงเติมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรอง วิตามิน เหล็ก และสารควบคุมการเจริญเติบโตลงไปตามลำดับ โดยเขย่าขวดให้น้ำยาผสมกันดีระหว่างแต่ละครั้งที่เติม จากนั้นละลายน้ำตาลใส่ลงไป แล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไปจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล เทสารละลายลงในบีกเกอร์ขนาด 2,000 มล จากนั้นนำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 5.7 โดยใช้ 1 N HCl หรือ 1 N KOH สำหรับเตรียมอาหารวุ้นและใส่วุ้นลงในอาหารแล้วนำไปต้มจนวุ้นละลาย ต่อจากนั้นตวงอาหารใส่หลอดทดลองขนาด 25 x 150 มม ปริมาณ 10 มล/หลอด หรือใส่ขวดทดลองปริมาณ 50 มล/ขวด หุ้มปากขวดหรือหลอดด้วยพลาสติกขนาด 70 x 90 มม หุ้มทับด้วยกระดาษลอกลาย แล้วรัดด้วยยางรัดของ ถ้าเป็นขวดก่อนหุ้มด้วยกระดาษทำการปิดฝาโลหะก่อน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่ 15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

ตาราง 5 ส่วนประกอบของสารละลายเข้มข้นแต่ละชนิดในอาหารสูตร MS ดัดแปลง

ชนิดของสารละลาย	ปริมาณสารละลายเข้มข้นเพื่อเตรียมอาหาร 1 ลิตร (มล)
สารละลายธาตุอาหารหลักความเข้มข้น 10X	100
สารละลายธาตุอาหารรองความเข้มข้น 100X	10
สารละลายวิตามินความเข้มข้น 100X	10
สารละลายเหล็กความเข้มข้น 100X	10
สารควบคุมการเจริญเติบโต	
NAA (10 มก ในน้ำยา 100 มล)	*
2,4-D (10 มก ในน้ำยา 100 มล)	*
BAP (10 มก ในน้ำยา 100 มล)	*
ซูโครส	30 ก/ล
วุ้น	8 ก/ล

* = ปริมาณที่ใช้ขึ้นกับความเข้มข้นในแต่ละกรรมวิธีในการทดลอง

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตาราง 6 ปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในแต่ละกรรมวิธี

ชนิดสาร	ความเข้มข้น (มก/ล)	ปริมาณที่ใช้ในอาหาร 100 มล
NAA	0.0	0
	0.5	0.5
	1.0	1.0
	2.0	2.0
	5.0	5.0
BAP	0.0	0
	0.5	0.5
	1.0	1.0
	2.0	2.0
	5.0	5.0
2,4-D	0.0	0
	0.01	0.01
	0.05	0.05
	0.25	0.25
	1.25	1.25

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

6. วิธีการวิจัย

การศึกษาแบ่งออกเป็น 5 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 การหาขนาดชิ้นส่วนที่เหมาะสมสำหรับการเริ่มต้นเลี้ยงหงส์เหินพันธุ์ดอกขาว

การทดลองนี้ใช้ส่วนโคนของต้นอ่อนที่ได้จากการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้ขนาดแตกต่างกัน 3 ขนาด คือ 0.2 , 0.3 และ 0.5 ซม ตามลำดับ โดยนำมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรพื้นฐาน MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 1.0 มก/ล (ตาราง 6)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ทำการทดลองกรรมวิธีละ 10 ซ้ำ

ทำการบันทึกผลทุกสัปดาห์ โดยบันทึกวันเริ่มเกิดหน่อใหม่ จำนวนยอดอ่อนต่อชิ้นส่วน ความสูงต้นโดยวัดจากส่วนโคนต้นถึงส่วนปลายใบที่สูงสุด และ วันเริ่มเกิดราก

ทำการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาถึงการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเพื่อดูการพัฒนาที่เกิดขึ้น

การทดลองที่ 2 ผลของ NAA และ BAP ต่อการแตกหน่อและการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนโคนต้นที่เลี้ยงบนอาหารวุ้น

ตัดเนื้อเยื่อบริเวณโคนต้นอ่อนที่ได้จากการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อหนา 0.5 ซม โดยเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA และ BAP แต่ละชนิดใช้ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0 , 0.5 , 1.0 , 2.0 และ 5.0 มก/ล (ตาราง 6)

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) รวม 25 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ

ทำการบันทึกผลทุกสัปดาห์ โดยบันทึกวันเริ่มเกิดหน่อใหม่ จำนวนยอดอ่อนต่อชิ้นส่วน ความสูงต้น จำนวนใบ วันที่เริ่มเกิดราก จำนวนรากและความยาวราก

การทดลองที่ 3 การเลี้ยงช่อดอกอ่อน

การทดลองที่ 3.1 การหาขนาดและเทคนิคการตัดช่อดอกอ่อนที่มีผลต่อการเกิดยอดใหม่

การทดลองนี้ใช้ปัจจัยร่วม 2 ปัจจัย คือ ใช้ช่อดอกอ่อน 3 ขนาด คือ น้อยกว่า 0.5 , 0.5 และ 1.0 ซม ทดลองร่วมกับการตัด 2 แบบ คือการตัดแบ่งครึ่งช่อดอกตามขวางและไม่ตัดแบ่งนำมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BAP 1.0 มก/ล

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) ทำการทดลองรวม 6 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ

บันทึกผลการทดลองทุกสัปดาห์ โดยบันทึก วันเริ่มเกิดหน่อใหม่ จำนวนยอดอ่อนต่อชิ้นส่วน ความสูงต้น จำนวนใบ และวันที่เริ่มเกิดราก

การทดลองที่ 3.2 ผลของ NAA และ BAP ต่อการพัฒนาของช่อดอกอ่อน

นำช่อดอกอ่อนขนาด 0.5 ซม มาตัดปลายยอดออก 0.1 ซม แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม NAA และ BAP ให้แต่ละชนิดมีความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0, 1.0 และ 5.0 มก/ล ตามลำดับ

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) ทำการทดลองรวม 9 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ

บันทึกผลการทดลองทุกสัปดาห์ โดยบันทึก วันเริ่มเกิดหน่อใหม่ จำนวนยอดอ่อนต่อชิ้นส่วน ความสูงต้น จำนวนใบ วันที่เริ่มเกิดรากและจำนวนราก

การทดลองที่ 4 ผลของ Thin cell layer ที่มาจากตำแหน่งข้อต่างกันต่อการพัฒนาและการเจริญของยอดใหม่

การทดลองนี้แบ่งเป็น 2 ปัจจัย คือ แบ่งตามตำแหน่งข้อที่ตัด 5 ตำแหน่ง คือ

ตำแหน่งที่ 1 บริเวณโคนต้นที่ติดกับราก (นับเป็นข้อที่ 1)
ตำแหน่งที่ 2 บริเวณข้อที่ถัดจากโคนต้นขึ้นมาข้อเดียว (นับเป็นข้อที่ 2)
ตำแหน่งที่ 3 บริเวณข้อที่ถัดจากโคนต้นขึ้นมาสองข้อ (นับเป็นข้อที่ 3)
ตำแหน่งที่ 4 บริเวณข้อที่ถัดจากโคนต้นขึ้นมาสามข้อ (นับเป็นข้อที่ 4)
ตำแหน่งที่ 5 บริเวณข้อที่ถัดจากโคนต้นขึ้นมาสี่ข้อ (นับเป็นข้อที่ 5)

ส่วนปัจจัยการตัดใช้วิธีการตัด โดยถือเอาจุดกึ่งกลางของข้อเป็นเกณฑ์ จากนั้นวัดความยาวขึ้นไปด้านบนห่าง 0.2 ซม แล้ววัดห่างลงมาทางด้านล่างอีก 0.2 ซม ใช้มีดตัดให้ได้ชิ้นส่วนพืชทั้งอัน มีความยาว 0.4 ซม ส่วนปัจจัยที่ 2 แบ่งตามลักษณะการตัด คือตัดแบ่งครึ่งตามขวางและตัดแบ่งครึ่งตามยาว จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 1.0 มก/ล เลี้ยงในสภาพแสงเป็นเวลานาน 8 สัปดาห์

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) การทดลองทั้งสิ้นรวม 10 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ

บันทึกผลเหมือนการทดลองที่ 2

การทดลองที่ 5 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนโคนต้น

การทดลองนี้มีจุดประสงค์ เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส สำหรับนำไปเป็นแนวทางการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยต่อไป การทดลองนี้ประกอบด้วย 2 การทดลองย่อย

การทดลองที่ 5.1 ผลของระดับ 2,4-D ที่มีต่อการเกิดแคลลัส

ตัดเนื้อเยื่อบริเวณโคนต้นที่ได้จากการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อหนา 0.2 ซม มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5 ระดับ คือ 0, 0.01, 0.05 , 0.25 และ 1.25 มก/ล ตามลำดับ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ

บันทึกผลทุกสัปดาห์ ความสูงของต้น จำนวนใบ จำนวนยอด และจำนวนราก

การทดลองที่ 5.2 ผลของความมืดและแสงที่มีต่อการเกิดแคลลัส

ตัดเนื้อเยื่อโคนต้นหนา 0.2 ซม เลี้ยงบนอาหารสูตรที่ได้จากการทดลองที่ 5.1 ว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดี นำมาเลี้ยงในที่มืดและที่สว่าง ทำการทดลอง 10 ซ้ำ

บันทึกผลทุกสัปดาห์ ได้แก่ น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัส และเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส

นำแคลลัสที่ได้ไปทำการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาถึงการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสในแต่ละสัปดาห์