

### บทที่ 3

#### วิธีการวิจัย

#### วัสดุอุปกรณ์

##### 1. วัสดุภัณฑ์

- 1) ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ
- 2) หม้อนิ่งความดัน
- 3) ตู้เย็น
- 4) เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง
- 5) เตารอบไมโครเวฟ
- 6) เครื่องชั่งทั้งแบบหยาบและแบบละเอียด
- 7) กล้องจุลทรรศน์
- 8) ชุดเครื่องแก้ว ได้แก่ บีกเกอร์, ขวดปรับปริมาตร, บีเปต, กรวยแก้ว, ขวดอาหาร, แท่งแก้วคนสาร
- 9) เครื่องมือที่ใช้ในการย้ายเนื้อเยื่อขนาดเล็ก ได้แก่
  - มีดผ่าตัด
  - เพลท
  - ตะเกียงแอลกอฮอล์
  - ปากคีบ
  - กรรไกร
  - ชั้นวางอุปกรณ์

##### 2. วัสดุและสารเคมี

- 1) เมล็ดแดงกวางพันธุ์มาลัย 759 (สายพันธุ์ไทย) และพันธุ์ซาตีกิมิโตริ (สายพันธุ์ญี่ปุ่น)
- 2) สารเคมี

- เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์
- สารเคมีในอาหารสูตร MS และ MMS
- ไซโตโคนิน ได้แก่ ไคเนติน
- จิบเบอเรลลิน ได้แก่ GA<sub>3</sub>
- เอทิลีน ได้แก่ เอทิลฟอน

### 3. อินทรีย์สาร

- 1) น้ำตาลซูโครส
- 2) ผงวุ้น

## วิธีการทดลอง

### การคัดเลือกเมล็ดพันธุ์แตงกวา

การทดลองในครั้งนี้ใช้เมล็ดพันธุ์แตงกวา 2 สายพันธุ์ ดังนี้

1. พันธุ์มาลัย 759 ซึ่งเป็นพันธุ์ไทยลูกผสม F1 คัดพิเศษ ที่มีลักษณะดี เนื้อหนา ใต้เล็ก ผลตรงยาวสม่ำเสมอ (ผลยาวประมาณ 11-13 เซนติเมตร) สีเขียวค่อนข้างเข้ม ให้ผลผลิตสูง ให้ผลทั้งในเถาหลักและเถาแขนง หน่ออ่อน สามารถเก็บไว้ได้นาน รสชาติหวานกรอบ (ภาพที่ 3.1)
2. พันธุ์ซาฮีมิโคริ เป็นแตงกวาสายพันธุ์ดั้งเดิมที่หายากของญี่ปุ่น มีลักษณะดี ผลตรงยาว มีสีเขียวเข้ม เนื้อมาก เมล็ดน้อย รสชาติดี ไม่ขม นิยมนำมารับประทานสดเป็นอย่างมาก ลักษณะเด่นคือ ให้ดอกตัวผู้มาก และจากรายงานก่อนหน้านี้ Naoi (2002) พบว่าเป็นพันธุ์ที่สามารถเกิดดอกได้ในสภาพปลอดเชื้อ(ภาพที่ 3.1)

โดยเมล็ดพันธุ์แตงกวาทั้ง 2 สายพันธุ์ที่จะนำมาทำการเพาะเลี้ยง จะต้องคัดเลือกเมล็ดที่มีความสมบูรณ์ ขนาดเท่ากัน และรูปร่างเหมือนกัน

### ภาพที่ 3.1

แตงกวาพันธุ์มาลัย 759 และพันธุ์ซาสึกิมิโดริ



### การเตรียมอุปกรณ์

อุปกรณ์ที่นำมาใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงนั้นจะต้องทำการฆ่าเชื้อก่อนนำมาทำการทดลอง

ขวดทดลอง : แชนสเตอร์ฆ่าเชื้อ (clean 99) ในอัตราส่วน 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร  
อย่างน้อย 1 คืน จากนั้นทำการล้างทำความสะอาด แล้วนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดัน

ฝาขวด : ฝาที่ไม่มีเมมเบรนฟิวเตอร์จะทำการล้างแล้วนึ่งฆ่าเชื้อ ส่วนฝาที่มีเมมเบรนฟิวเตอร์จะไม่นำไปล้าง เนื่องจากเป็นการถนอม และยืดอายุการใช้งานของแผ่นเมมเบรนฟิวเตอร์ โดยจะทำความสะอาดโดยใช้ กระดาษทิชชูชุบเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เช็ดทำความสะอาด จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อพร้อมขวดทดลอง

### ภาพที่ 3.2

ลักษณะของฝาที่มีเมมเบรนฟิวเตอร์และฝาที่ไม่มีเมมเบรนฟิวเตอร์



#### การเตรียมอาหารสังเคราะห์สำหรับการเพาะเลี้ยง

โดยใช้อาหารสูตร Murashige and Skoog หรือสูตร MS (Murashige & Skoog , 1962) ในการเพาะเมล็ดแตงกวา และอาหารสูตร Modify Murashige and Skoog หรือสูตร MMS (Hisajima et al., 1987) ในการชักนำดอกและชักนำให้ดอกบาน ซึ่งอาหารแต่ละสูตรได้จัดทำเป็น stock solution ไว้แล้ว เตรียมได้โดยการดูดจาก stock solution ที่เตรียมไว้ ทำการปรับปริมาตร จากนั้นนำไปปรับ pH=5.7 เติมน้ำตาล 30 กรัม/ลิตร ผงวุ้น 8 กรัม/ลิตร นำไปต้มจนวุ้นละลาย และนำมาใส่ขวดสำหรับอาหารสูตร MS ใช้ขวดทดลองขนาด 225 มิลลิลิตร ส่วนสำหรับอาหารสูตร MMS ใช้ขวดทดลองขนาด 900 มิลลิลิตร แล้วทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ นาน 20 นาที

#### วิธีการฟอกฆ่าเชื้อและเพาะเลี้ยงเมล็ดแตงกวา

นำเมล็ดที่ทำการคัดเลือกแล้วมาฟอกฆ่าเชื้อก่อนการเพาะเลี้ยง โดยอันดับแรกทำการฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นล้างด้วยน้ำเปล่าที่ทำ

การนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเป็นเวลา 1 นาที แล้วทำการพอกฆ่าเชื้อโดยใช้โซเดียมไฮโปคลอไรต์ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการล้างด้วยน้ำเปล่า 5 ครั้ง เป็นเวลา 1,3,5,7 และ 9 นาที ตามลำดับ หลังพอกฆ่าเชื้อเสร็จเรียบร้อยแล้ว นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส ช่วงแสงสว่าง 16 ชั่วโมง ต่อวัน ความเข้มแสงประมาณ  $35 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$  โดยใช้หลอดฟลูออเรสเซนต์เป็น แหล่งกำเนิดแสง

### ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดดอกและการบานของดอกแตงกวา ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ

#### การศึกษาอิทธิพลของการเปลี่ยนและช่วงเวลาในการเปลี่ยนไปใช้ผ้าที่มีเมมเบรนพีวี เตอร์

นำต้นอ่อนแตงกวาพันธุ์มาลัย 759 และพันธุ์ชาลีกิโมโดริ อายุ 3 สัปดาห์ที่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารสูตร MS มาทำการตัดแต่งเนื้อเยื่อให้มีความยาวจากบริเวณปลายยอดประมาณ 3 เซนติเมตร แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MMS เพื่อศึกษาเปรียบเทียบจำนวนของดอกตัวเมียที่เกิดขึ้นและบาน เมื่อเปลี่ยนไปใช้ผ้าที่มีเมมเบรนพีวีเตอร์ที่สัปดาห์ต่างๆ ดังนี้

1. ใช้ผ้าที่ไม่มีเมมเบรนพีวีเตอร์ตลอดการทดลอง
2. เปลี่ยนไปใช้ผ้าที่มีเมมเบรนพีวีเตอร์หลังจากการย้ายอาหาร 1 สัปดาห์
3. เปลี่ยนไปใช้ผ้าที่มีเมมเบรนพีวีเตอร์หลังจากการย้ายอาหาร 3 สัปดาห์

ทำการเพาะเลี้ยงต่อภายใต้อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส ใช้ความเข้มแสง  $35 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$  โดยใช้หลอดฟลูออเรสเซนต์เป็นแหล่งกำเนิดแสง ให้ได้รับแสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวันเป็นเวลา 9 สัปดาห์ ทำการเก็บข้อมูลทุกสัปดาห์หลังจากการเพาะเลี้ยง โดยทำการตรวจนับจำนวนดอกตัวเมียที่เกิดขึ้นและบานในแต่ละสัปดาห์ เพื่อนำมาหาเปอร์เซ็นต์ของการเกิดดอก จำนวนดอกที่เกิดขึ้นต่อต้น จำนวนดอกบานต่อต้น เปอร์เซ็นต์ของดอกที่บาน วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดสอบพรีทเมนต์ละ 5 ซ้ำ

## การศึกษาอิทธิพลของการใช้พาราฟฟินเหลวเคลือบบนผิวหน้าอาหาร

นำต้นอ่อนแตงกวาพันธุ์มาลัย 759 อายุ 3 สัปดาห์ ที่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารสูตร MS มาทำการตัดแต่งเนื้อเยื่อให้มีความยาวจากบริเวณปลายยอดประมาณ 3 เซนติเมตร แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MMS เพื่อศึกษาเปรียบเทียบจำนวนของดอกตัวเมียที่เกิดขึ้นและบานจากอาหารที่มีการเคลือบด้วยพาราฟฟินเหลวปริมาณต่างๆ ดังนี้

1. ไม่ใช้พาราฟฟินเหลว
2. ใช้พาราฟฟินเหลว 10 มิลลิลิตร
3. ใช้พาราฟฟินเหลว 15 มิลลิลิตร

ทำการเพาะเลี้ยงต่อภายใต้อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง  $35 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$  โดยใช้หลอดฟลูออเรสเซนต์เป็นแหล่งกำเนิดแสง ให้ได้รับแสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวันเป็นเวลา 9 สัปดาห์ การใช้พาราฟฟินเหลวเคลือบบนผิวหน้าอาหาร ทำหลังจากที่เพาะเลี้ยงไปแล้ว 1 สัปดาห์ เก็บข้อมูลทุกสัปดาห์หลังใช้พาราฟฟินเหลว โดยทำการตรวจนับจำนวนดอกตัวเมียที่เกิดขึ้นและบานในแต่ละสัปดาห์ เพื่อนำมาหาเปอร์เซ็นต์ของการเกิดดอก จำนวนดอกที่เกิดขึ้น จำนวนดอกบานต่อต้น เปอร์เซ็นต์ของดอกที่บาน วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดสอบทรีทเมนต์ละ 6 ซ้ำ

## การศึกษาอิทธิพลของฮอร์โมนไคเนติน

นำต้นอ่อนแตงกวาพันธุ์ชาลีกิโดริ อายุ 3 สัปดาห์ ที่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารสูตร MS มาทำการตัดแต่งเนื้อเยื่อให้มีความยาวจากบริเวณปลายยอดประมาณ 3 เซนติเมตร แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MMS ในขบวนการทดลองใช้ผ้าแบบที่ไม่มีเมมเบรนพิวเตอร์ เพื่อศึกษาเปรียบเทียบจำนวนของดอกตัวเมียที่เกิดขึ้นและบานจากอาหารที่มีการเติมไคเนตินที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

1. ความเข้มข้น 0 ppm
2. ความเข้มข้น 0.022 ppm

3. ความเข้มข้น 0.108 ppm

4. ความเข้มข้น 0.215 ppm

หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MMS ในขวดทดลองซึ่งใช้ฝาที่ไม่มีเมมเบรนฟิวเตอร์ เพื่อกระตุ้นให้มีการชักนำดอกเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำการเปลี่ยนถ่ายอาหาร เพื่อชักนำให้ดอกบาน โดยการตัดต้นแต่งกว่าจากบริเวณโคนต้น ทำการตัดใบที่แห้งและไม่สมบูรณ์ออก แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MMS ขวดใหม่ที่ขวดทดลองมีการใช้ฝาที่มีเมมเบรนฟิวเตอร์ ศึกษาเกี่ยวกับการใช้ฮอร์โมนโคเนดินที่ความเข้มข้นต่างๆ เช่นเดิม ดังนี้

1. ความเข้มข้น 0 ppm

2. ความเข้มข้น 0.022 ppm

3. ความเข้มข้น 0.108 ppm

4. ความเข้มข้น 0.215 ppm

ทำการเพาะเลี้ยงต่อภายใต้อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส ใช้ความเข้มแสง  $35 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$  โดยใช้หลอดฟลูออเรสเซนต์เป็นแหล่งกำเนิดแสง ให้ได้รับแสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยทำการตรวจนับจำนวนดอกตัวเมียที่เกิดขึ้นและบานทุกสัปดาห์หลังจากการตัดแต่งเนื้อเยื่อในครั้งแรก เป็นเวลา 9 สัปดาห์ เพื่อนำมาหาเปอร์เซ็นต์ของการเกิดดอก จำนวนดอกที่เกิดขึ้น ต่อต้น จำนวนดอกบานต่อต้น เปอร์เซ็นต์ของดอกที่บาน วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดสอบทีทีเมนส์ละ 7 ซ้ำ

### การศึกษาอิทธิพลของฮอร์โมนเอทธิฟอน

นำต้นอ่อนแต่งกว่าพันธุ์ชาสีกิมิโดริ อายุ 3 สัปดาห์ ที่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารสูตร MS มาทำการตัดแต่งเนื้อเยื่อให้มีความยาวจากบริเวณปลายยอดประมาณ 3 เซนติเมตร แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MMS ในขวดทดลองซึ่งใช้ฝาแบบที่ไม่มีเมมเบรนฟิวเตอร์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบจำนวนของดอกตัวเมียที่เกิดขึ้นและบาน จากการหยุดเอทธิฟอน ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บริเวณปลายยอด หลังจากการถ่ายอาหารไปแล้ว 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นหยุดทุกๆ 2 สัปดาห์ โดยใช้ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

1. ความเข้มข้น 0 ppm
2. ความเข้มข้น 1 ppm
3. ความเข้มข้น 5 ppm

หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MMS ในขวดทดลองซึ่งใช้ฝาที่ไม่มีเมมเบรนพีวีเตอร์ เพื่อกระตุ้นการชักนำดอกเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำการเปลี่ยนถ่ายอาหารเพื่อชักนำให้ดอกบาน โดยการตัดต้นแต่งกว่าจากบริเวณโคนต้น ทำการตัดใบที่แห้งและไม่สมบูรณ์ออก แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MMS ขวดใหม่ที่ขวดทดลองใช้ฝาที่มีเมมเบรนพีวีเตอร์ โดยศึกษา ร่วมกับการหยดฮอร์โมนเอทธิฟอนหลังจากเปลี่ยนถ่ายอาหารแล้ว 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นหยุดทุกๆ 2 สัปดาห์ จนถึงสัปดาห์ที่ 12 โดยใช้เอทธิฟอนที่ความเข้มข้นเช่นเดิม ดังนี้

1. ความเข้มข้น 0 ppm
2. ความเข้มข้น 1 ppm
3. ความเข้มข้น 5 ppm

ทำการเพาะเลี้ยงต่อภายใต้อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส ใช้ความเข้มแสง  $35 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$  โดยใช้หลอดฟลูออเรสเซนต์เป็นแหล่งกำเนิดแสง ให้ได้รับแสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยทำการตรวจนับจำนวนดอกตัวเมียที่เกิดและบานทุกสัปดาห์หลังจากการตัดแต่งเนื้อเยื่อในครั้งแรก เป็นเวลา 9 สัปดาห์ เพื่อนำมาหาเปอร์เซ็นต์ของการเกิดดอก จำนวนดอกที่เกิดต่อต้น จำนวนดอกบานต่อต้น เปอร์เซ็นต์ของดอกที่บาน วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดสอบทรีทเมนต์ละ 6 ซ้ำ

### การศึกษาอิทธิพลของฮอร์โมนจิบเบอเรลลิน

นำต้นอ่อนแต่งกว่าพันธุ์มาลัย 759 อายุ 3 สัปดาห์ ที่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารสูตร MS มาทำการตัดแต่งเนื้อเยื่อให้มีความยาวจากบริเวณปลายยอดประมาณ 3 เซนติเมตร แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MMS ใช้ขวดการทดลองซึ่งใช้ฝาแบบที่ไม่มีเมมเบรนพีวีเตอร์ เพื่อศึกษาเปรียบเทียบจำนวนของดอกตัวเมียที่เกิดขึ้นและบานจากอาหารที่มีการเติมจิบเบอเรลลินที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

1. ความเข้มข้น 0 ppm
2. ความเข้มข้น 1 ppm
3. ความเข้มข้น 10 ppm
4. ความเข้มข้น 50 ppm
5. ความเข้มข้น 100 ppm

หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MMS เพื่อกระตุ้นการชักนำดอกเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำการเปลี่ยนไปใช้ผ้าที่มีเมมเบรนฟิวเตอร์ เพื่อชักนำให้ดอกบาน โดยตัดใบที่แห้งและไม่สมบูรณ์ออกทุกๆ 1 สัปดาห์ และเติมอาหารเหลวสูตร MMS ที่ความเข้มข้นจิบเบอเรลลิน เช่นเดิมทุกๆ 2 สัปดาห์ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงต่อภายใต้อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส ใช้ความเข้มแสง  $35 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$  โดยใช้หลอดฟลูออเรสเซนต์เป็นแหล่งกำเนิดแสง ให้ได้รับแสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ตรวจนับจำนวนดอกตัวเมียที่เกิดและบานทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 9 สัปดาห์ เพื่อนำมาหาเปอร์เซ็นต์ของการเกิดดอก จำนวนดอกที่เกิดต่อต้น จำนวนดอกบานต่อต้น เปอร์เซ็นต์ของดอกที่บาน วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดสอบทรีทเมนต์ละ 7 ซ้ำ

### ศึกษาอิทธิพลของน้ำตาลซูโครส

นำต้นอ่อนแต่งกวาพันธุ์มาลัย 759 อายุ 3 สัปดาห์ ที่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารสูตร MS มาทำการตัดแต่งเนื้อเยื่อให้มีความยาวจากบริเวณปลายยอดประมาณ 3 เซนติเมตร แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MMS ในขบวนการทดลองซึ่งใช้ผ้าแบบที่ไม่มีเมมเบรนฟิวเตอร์ เพื่อศึกษาเปรียบเทียบจำนวนของดอกตัวเมียที่เกิดขึ้นและบานจากอาหารที่มีการเติมน้ำตาลซูโครสปริมาณต่างๆ ดังนี้

1. น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร
2. น้ำตาลซูโครส 50 กรัมต่อลิตร
3. น้ำตาลซูโครส 70 กรัมต่อลิตร

หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MMS เพื่อกระตุ้นการชักนำดอกเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำการเปลี่ยนไปใช้ผ้าที่มีเมมเบรนฟิวเตอร์ เพื่อทำการชักนำให้ดอกบาน โดยตัดใบที่แห้งและไม่สมบูรณ์ออกทุกๆ 1 สัปดาห์ นำไปเพาะเลี้ยงต่อภายใต้อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส ใช้ความเข้มแสง  $35 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$  โดยใช้หลอดฟลูออเรสเซนต์เป็นแหล่งกำเนิดแสง ให้ได้รับแสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ตรวจสอบจำนวนดอกตัวเมียที่เกิดและบานทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 9 สัปดาห์ เพื่อนำมาหาเปอร์เซ็นต์ของการเกิดดอก จำนวนดอกที่เกิดต่อต้น จำนวนดอกบานต่อต้น เปอร์เซ็นต์ของดอกที่บาน วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดสอบทรีทเมนต์ละ 12 ซ้ำ

### ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิ

นำต้นอ่อนแดงกว่าพันธุ์มาลัย 759 อายุ 3 สัปดาห์ที่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารสูตร MS มาทำการตัดแต่งเนื้อเยื่อให้มีความยาวจากบริเวณปลายยอดประมาณ 3 เซนติเมตร แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MMS ในขวดการทดลองซึ่งใช้ผ้าแบบที่ไม่มีเมมเบรนฟิวเตอร์ เพื่อศึกษาเปรียบเทียบจำนวนของดอกตัวเมียที่เกิดขึ้นและบานจากการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้

1. อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส
2. อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
3. อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MMS เพื่อกระตุ้นการชักนำดอกเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำการเปลี่ยนไปใช้ผ้าที่มีเมมเบรนฟิวเตอร์ เพื่อชักนำให้ดอกบาน โดยตัดใบที่แห้งและไม่สมบูรณ์ออกทุกๆ 1 สัปดาห์ นำไปเพาะเลี้ยงต่อภายใต้อุณหภูมิต่างๆ เช่นเดิม ใช้ความเข้มแสง  $35 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$  โดยใช้หลอดฟลูออเรสเซนต์เป็นแหล่งกำเนิดแสง ให้ได้รับแสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ตรวจสอบจำนวนดอกตัวเมียที่เกิดและบานทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 9 สัปดาห์ เพื่อนำมาหาเปอร์เซ็นต์ของการเกิดดอก จำนวนดอกที่เกิดต่อต้น จำนวนดอกบานต่อต้น เปอร์เซ็นต์ของดอกที่บาน วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดสอบทรีทเมนต์ละ 13 ซ้ำ

## ทดสอบการผสมข้ามของแตงกวา

### ตรวจเช็คความสามารถในงอกของละอองเกสรตัวผู้

ทำการตรวจเช็คความสามารถในการงอกของเกสรตัวผู้ในอาหารสังเคราะห์สูตร Brewbaker's medium (Brewbaker & Kwach, 1963) ที่เติมน้ำตาลซูโครส 100 กรัมต่อลิตร โดยนำเกสรตัวผู้ของแตงกวามาเกลี่ยบนสไลด์แล้วหยดอาหารลงบนเกสรตัวผู้ เลี้ยงที่อุณหภูมิ  $27 \pm 2$  องศาเซลเซียส ที่มีการให้ความชื้น เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วนำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์

### วิธีการทดสอบการผสมของแตงกวาที่ปลูกในสภาพแปลงปลูก

ทดสอบโดยนำเกสรตัวผู้ต่างสายพันธุ์กับดอกตัวเมียที่บ้านแล้วมาทำการผสม โดยจะต้องกำจัดดอกตัวผู้ของพันธุ์ที่เป็นพันธุ์แม่ภายในต้นเดียวกัน ในการผสมต้องคำนึงถึงเวลาที่จะทำการผสม ควรทำการผสมในตอนเช้า เนื่องจากดอกแตงกวาจะบานในตอนเช้า และจะหุบในตอนบ่ายของวันเดียวกัน หลังจากผสมแล้วสองวัน ตรวจเช็คอัตราการผสมติด โดยตรวจสอบได้จากการสังเกตบริเวณรังไข่ของดอกตัวเมีย ถ้าหากผสมติด รังไข่จะเจริญใหญ่ขึ้น ส่วนถ้าผสมไม่ติดดอกตัวเมียจะเหี่ยวในที่สุด

### วิธีการทดสอบการผสมของแตงกวาที่ปลูกในสภาพปลอดเชื้อ

ทดสอบโดยนำเกสรตัวผู้ต่างสายพันธุ์กับดอกตัวเมียที่บ้านแล้วมาทำการผสมภายในตู้ปลอดเชื้อ โดยต้องคำนึงถึงเวลาที่จะทำการผสม ควรทำการผสมในตอนเช้า เนื่องจากดอกแตงกวาจะบานในตอนเช้า และจะหุบในตอนบ่ายของวันเดียวกัน หลังจากผสมแล้วสองวัน ตรวจเช็คอัตราการผสมติด โดยตรวจสอบได้จากการสังเกตบริเวณรังไข่ของดอกตัวเมีย ถ้าหากผสมติด รังไข่จะเจริญใหญ่ขึ้น ส่วนถ้าผสมไม่ติดดอกตัวเมียจะเหี่ยวตายในที่สุด

## การวิเคราะห์ข้อมูลจากการทดลอง

วิเคราะห์การทดลอง โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) ทดสอบผลความแปรปรวนโดย One way analysis of variance จากนั้นทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างหน่วยทดลอง โดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p \leq 0.05$ ) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เวอร์ชัน 11.5

## สถานที่ทำการวิจัย

ทำการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประเทศน์ และห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี