บทที่ 3
วิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์

1.ต้นพันธุ์ฟิโลเดนดรอน

2.เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด ใช้ชั่งสารเคมีต่าง ๆ ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.2 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง ใช้วัดความเป็นกรดด่างของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.3 เครื่องทำน้ำกลั่น ใช้กลั่นน้ำเพื่อเตรียมอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและเตรียมสารละลายฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช

2.4 หม้อนึ่งความดัน แบบไฟฟ้า ใช้สำหรับนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์อาหารและเสื้อกราวน์ ผ้า กระดาษ ใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-30 นาที

2.5 ตู้อบฆ่าเชื้อ ใช้อบฆ่าเชื้อชุดผ่าตัดและจานเลี้ยงเชื้อ

2.6 ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ ใช้ถ่ายเนื้อเยื่อพืช

2.7 ตู้เย็น ใช้เก็บสารละลายธาตุอาหาร ฮอร์โมน และวิตามิน สำหรับเตรียมสูตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.8 เตาแก๊ส ใช้ต้มอาหารเลี้ยงพืชเพื่อให้ผงวุ้นละลาย

3.เครื่องแก้วชนิดต่าง ๆ

3.1 กระบอกตวง ขนาด 10,25,50,100,500 ,1,000 และ 2,000 มิลลิลิตรใช้ตวงสารละลายเตรียมอาหารเลี้ยงพืชและเตรียมแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

3.2 บีกเกอร์ ขนาด 50,100 ,500 และ 1,000 มิลลิลิตรใช้ตวงน้ำกลั่น ผสมสารเคมีหรือผสมอาหารเลี้ยงพืช

3.3 ปิเปตต์ ขนาด 0.1, 1.0 ,5.0 และ 10.0 มิลลิลิตร ใช้ดูดสารละลายสำหรับเตรียมอาหาร

3.4 ขวดวัดปริมาตร ขนาด 250,500 และ 1,000 มิลลิลิตร ใช้วัดปริมาตรสารละลาย และวัดปริมาตรอาหารที่ผสม

3.5 แท่งแก้วคน ใช้สำหรับคนอาหาร และสารละลาย

3.6 ขวดแก้ว ขนาด 100 และ 200 มิลลิลิตร ใช้ใส่อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

3.7 จานเพาะเชื้อ ใช้สำหรับวางชิ้นส่วนเนื้อเยื่อในการตัดแบ่งเนื้อเยื่อ

3.8 ตะเกียงแอลกอฮอล์ สำหรับจุดไฟเผาเครื่องมือ

3.9 เครื่องมือผ่าตัด เช่น มีดผ่าตัด ใบมีด ปากคีบ

4.สารเคมีต่าง ๆ

4.1 สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962)

4.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชเช่น TDZ(Thidiazuron) NAA (1-Naphthalene acetic acid) IAA (Indole-3-acetic acid) IBA (Indole -3- butyric acid)

4.3 สารเคมีสำหรับฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อพืชเช่น คลอร็อกซ์ สารจับใบ(ทวิน20) แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์

4.4 ผงวุ้นใช้ผสมสูตรอาหารให้แข็งตัว

4.5 น้ำตาลทรายซูโครส เป็นแหล่งให้พลังงาน

5.ชั้นวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ

6.อุปกรณ์ถ่ายภาพ

วิธีการทดลอง

แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ตอน โดยศึกษาในเรื่องดังนี้

1.ศึกษาด้านชักนำให้เกิดต้นรวม โดยศึกษาระดับความเข้มข้นของ TDZ ที่เหมาะสมในการชักนำให้เนื้อเยื่อส่วนลำต้นของฟิโลเดนดรอนเกิดแคลลัสและต้น

2.ศึกษาการชักนำให้เกิดราก โดยศึกษาระดับความเข้มข้นของ IAA IBA และ NAA ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดราก

3.ศึกษาการปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก โดยศึกษาอัตราการรอดชีวิต

การทดลองตอนที่ 1 ศึกษาชักนำให้เนื้อเยื่อเกิดต้นรวม

1.นำเนื้อเยื่อลำต้นส่วนยอดของฟิโลเดนดรอนมาล้างน้ำเปล่าให้สะอาด แล้วจึงนำไปล้างด้วยน้ำยาล้างจาน ปล่อยให้น้ำไหลผ่านประมาณ 15 นาที นำเข้าตู้ปลอดเชื้อ โดยแช่เนื้อเยื่อในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที แช่ในคลอร็อกซ์ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เติมทวิน20 1-2 หยด เขย่าเป็นเวลา 30 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง

2.นำชิ้นส่วนพืชที่ฆ่าเชื้อแล้ว มาตัดแต่งเนื้อเยื่อให้มีขนาดเท่ากัน วางเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ ที่ทำการทดลอง เปลี่ยนอาหารทุก 30 วัน เป็นเวลา 90 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) สูตรอาหารมีดังนี้

สูตรที่ 1 อาหารสูตร MS เติม TDZ ความเข้มข้น 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 2 อาหารสูตร MS เติม TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 3 อาหารสูตร MS เติม TDZ ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 4 อาหารสูตร MS เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 5 อาหารสูตร MS เติม TDZ ความเข้มข้น 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 6 อาหารสูตร MS เติม TDZ ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 7 อาหารสูตร MS เติม TDZ ความเข้มข้น 1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 8 อาหารสูตร MS เติม TDZ ความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 9 อาหารสูตร MS เติม TDZ ความเข้มข้น 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตร

วิธีการเตรียมอาหาร

เตรียมสารเคมี ธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรอง ให้เป็นสารละลายเข้มข้นไว้ จากนั้นจึงตวงสารละลายให้ได้ปริมาตรตามที่กำหนดไว้ แล้วนำมาผสมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตในแต่ละสิ่งทดลอง ตามความเข้มข้นที่กำหนด เติมน้ำตาลซูโครส คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตร ให้ได้ตามที่ต้องการ ปรับความเป็นกรดด่างให้ได้ pH 5.8 เติมผงวุ้น คนให้เข้ากัน นำไปต้ม เมื่อผงวุ้นละลาย นำไปบรรจุในขวดแก้วขณะที่ยังร้อน โดยบรรจุขวดละ 20 มิลลิลิตร ปิดฝาให้เรียบร้อย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบกำหนด ความดันลดลงที่ศูนย์ นำออกจากหม้อนึ่งวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน นำไปเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่อไป

การทดลองตอนที่ 2 ศึกษาการชักนำให้เกิดราก

เมื่อนำตายอดของฟิโลเดนดรอนที่สมบูรณ์ วางเลี้ยงในสูตรอาหารต่างๆ ขวดละ 1 ชิ้น เป็นเวลา 45 วัน มีสูตรอาหารดังนี้

สูตรที่ 1 อาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (Control)

สูตรที่ 2 อาหารสูตร MS เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 3 อาหารสูตร MS เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 4 อาหารสูตร MS เติม NAA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 5 อาหารสูตร MS เติม IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 6 อาหารสูตร MS เติม IAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 7 อาหารสูตร MS เติม IAA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 8 อาหารสูตร MS เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 9 อาหารสูตร MS เติม IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 10 อาหารสูตร MS เติม IBA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองตอนที่ 3 ศึกษาการมีชีวิตรอดในสภาพแวดล้อมภายนอก

นำต้นที่งอกรากแล้วออกมาจากขวดเพาะเลี้ยง ใช้ปากคีบดึงต้นออกจากขวด ล้างวุ้นที่ติดมากับต้นออกให้หมด ล้างด้วยน้ำประปา 3-4 ครั้ง นำต้นแช่ในน้ำยาฆ่าเชื้อราแนน 15 นาที ปลูกในวัสดุปลูกดินผสม ทรายผสมขี้เถ้าแกลบอัตราส่วน 1:1:1 วางเลี้ยงในเรือนเพาะชำพรางแสง 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 60 วัน ให้น้ำทุกวัน วันละ 1 ครั้ง

การบันทึกข้อมูล

การศึกษาตอนที่ 1 บันทึกข้อมูลเมื่ออายุ 90 วัน โดยบันทึก จำนวนยอด จำนวนใบ

การศึกษาตอนที่ 2 เมื่ออายุ 45 วัน โดยบันทึก จำนวนราก ความยาวราก

การศึกษาตอนที่ 3 เมื่ออายุ 60 วัน คิดอัตราการรอดชีวิต

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลที่ได้จากการศึกษาแต่ละขั้นตอนมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละสิ่งทดลอง โดยใช้วิธี Duncan's new Multiple Range Test(DMRT)

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

เริ่มดำเนินการวิจัยตั้งแต่ เดือนพฤศจิกายน 2545 ถึงเดือน กรกฎาคม 2546

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันราชภัฏสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา