

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์

1. ต้นพันธุ์พืชโลเดนครอน

2. เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เนื้อเยื่อพืช

2.1 เครื่องซังไฟฟ้าแบบละเอียด ใช้ซังสารเคมีต่าง ๆ ในการเตรียมอาหารเลี้ยง

เนื้อเยื่อพืช

2.2 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง ใช้วัดความเป็นกรดต่างของอาหารเพาะเลี้ยง

2.3 เครื่องทำน้ำกลั่น ใช้กลั่นน้ำเพื่อเตรียมอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและเตรียมสารละลายฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช

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

2.5 ตู้อบฆ่าเชื้อ ใช้อบฆ่าเชื้อชุดผ่าตัดและจานเลี้ยงเชื้อ

2.6 ตู้อ่างเนื้อเยื่อ ใช้ถ่างเนื้อเยื่อพืช

2.7 ตู้อุ่น ใช้เก็บสารละลายธาตุอาหาร ฮอริโมน และวิตามิน สำหรับเตรียมสูตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.8 เตาแก๊ส ใช้ต้มอาหารเลี้ยงพืชเพื่อให้ผงวันละลาย

3. เครื่องแก้วชนิดต่าง ๆ

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

3.2 ปีกเกอร์ ขนาด 50, 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร ใช้ตวงน้ำกลั่น ผสมสารเคมีหรือผสมอาหารเลี้ยงพืช

3.3 ปีเปตต์ 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 งานเพาะเชื้อ 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 คลอโรกซ์ สารจับใบ(ทวิน20) แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์

4.4 ผงวุ้นใช้ผสมสูตรอาหารให้แข็งตัว

4.5 น้ำตาลทรายชูโครส เป็นแหล่งให้พลังงาน

5. ชั้นวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ

6. อุปกรณ์ถ่ายภาพ

วิธีการทดลอง

แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ตอน โดยศึกษาในเรื่องดังนี้

1. ศึกษาด้านชักนำให้เกิดต้นรวม โดยศึกษาระดับความเข้มข้นของ TDZ ที่เหมาะสมในการชักนำให้เนื้อเยื่อส่วนลำต้นของฟีโลเดนดรอนเกิดแคลลัสและต้น
 2. ศึกษาการชักนำให้เกิดราก โดยศึกษาระดับความเข้มข้นของ IAA IBA และ NAA ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดราก
 3. ศึกษาการปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก โดยศึกษาอัตราการรอดชีวิต
- การทดลองตอนที่ 1 ศึกษาชักนำให้เนื้อเยื่อเกิดต้นรวม**
1. นำเนื้อเยื่อลำต้นส่วนยอดของฟีโลเดนดรอนมาล้างน้ำเปล่าให้สะอาด แล้วจึงนำไปล้างด้วยน้ำยาล้างจาน ปล่อยให้แห้งประมาณ 15 นาที นำเข้าตู้ปลอดเชื้อ โดยแช่เนื้อเยื่อในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที แช่ในคลอโรกซ์ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เต็มทวิน20 1-2 หยด แช่เป็นเวลา 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 เต็ม TDZ ความเข้มข้น 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
 สูตรที่ 2 อาหารสูตร MS เต็ม TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
 สูตรที่ 3 อาหารสูตร MS เต็ม TDZ ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร
 สูตรที่ 4 อาหารสูตร MS เต็ม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
 สูตรที่ 5 อาหารสูตร MS เต็ม TDZ ความเข้มข้น 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร
 สูตรที่ 6 อาหารสูตร MS เต็ม TDZ ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
 สูตรที่ 7 อาหารสูตร MS เต็ม TDZ ความเข้มข้น 1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร
 สูตรที่ 8 อาหารสูตร MS เต็ม TDZ ความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อลิตร
 สูตรที่ 9 อาหารสูตร MS เต็ม TDZ ความเข้มข้น 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตร

วิธีการเตรียมอาหาร

เตรียมสารเคมี ธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรอง ให้เป็นสารละลายเข้มข้นไว้ จากนั้นจึง
 ตวงสารละลายให้ได้ปริมาตรตามที่กำหนดไว้ แล้วนำมาผสมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตใน
 แต่ละสิ่งทดลอง ตามความเข้มข้นที่กำหนด เติมน้ำตาลซูโครส คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตร ให้ได้
 ตามที่ต้องการ ปรับความเป็นกรดต่างให้ได้ pH 5.8 เติมผงขุ่น คนให้เข้ากัน นำไปต้ม เมื่อ
 ผงขุ่นละลาย นำไปบรรจุในขวดแก้วขณะที่ยังร้อน โดยบรรจุขวดละ 20 มิลลิลิตร ปิดฝาให้เรียบร้อย
 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา
 20 นาที เมื่อครบกำหนด ความดันลดลงที่ศูนย์ นำออกจากหม้อนึ่งวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2
 วัน นำไปเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่อไป

การทดลองตอนที่ 2 ศึกษาการชักนำให้เกิดราก

เมื่อนำตายอดของพิโลเดนดรอนที่สมบูรณ์ วางเลี้ยงในสูตรอาหารต่างๆ ขวดละ 1 ชิ้น เป็น
 เวลา 45 วัน มีสูตรอาหารดังนี้

- สูตรที่ 1 อาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (Control)
 สูตรที่ 2 อาหารสูตร MS เต็ม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
 สูตรที่ 3 อาหารสูตร MS เต็ม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
 สูตรที่ 4 อาหารสูตร MS เต็ม NAA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
 สูตรที่ 5 อาหารสูตร MS เต็ม IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
 สูตรที่ 6 อาหารสูตร MS เต็ม IAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
 สูตรที่ 7 อาหารสูตร MS เต็ม IAA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 8 อาหารสูตร MS เต็ม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 9 อาหารสูตร MS เต็ม IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรที่ 10 อาหารสูตร MS เต็ม IBA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองตอนที่ 3 ศึกษาการมีชีวิตรอดในสภาพแวดล้อมภายนอก

นำต้นที่งอกรากแล้วออกมาจากขวดเพาะเลี้ยง ใช้ปากคีบตั้งต้นออกจากขวด ล้างวันที่ติดมากับต้นออกให้หมด ล้างด้วยน้ำประปา 3-4 ครั้ง นำต้นแช่ในน้ำยาฆ่าเชื้อรานาน 15 นาที ปลุกในวัสดุปลูกดินผสม ทราวยผสมซีเ็ก้าเกลบอัตราส่วน 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 คัดอัตราการรอดชีวิต

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลที่ได้จากการศึกษาแต่ละขั้นตอนนี้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (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