

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์

1. สารเคมี ได้แก่ อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชสูตรเอ็มเอส (Murashige and Skoog, 1962) สารควบคุมการเจริญเติบโตไอเอเอ (3-Indoleacetic acid) บีเอ (Benzyladenine) เอ็นเอเอ (α - Naphthalene acetic acid) สารเคมีที่ใช้ในการกำจัดสิ่งปนเปื้อน ได้แก่ แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ คลอโรกซ์ ทวิน 20 ยาฆ่าเชื้อรา
2. เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 4 ออนซ์ พร้อมฝาพลาสติกใสทนความร้อน บีกเกอร์ขนาดต่างๆ กระบอกตวง ปิเปตต์ ขวดใส่สารเคมีสีชา กรวยแก้ว จากเลี้ยงเชื้อ
3. ครุภัณฑ์ ได้แก่ ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อชนิดลามินาร์ ฟโลคาบินेट (Laminar flow cabinet) หม้อนึ่งอัตโนมัติ ตู้อบ เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง เครื่องกลั่นน้ำแบบแก้ว เครื่องชั่งสารอย่างละเอียด จุดศรนิยม 4 ตำแหน่ง เครื่องชั่งอย่างหยาบ
4. อุปกรณ์ผ่าตัด ได้แก่ มีดผ่าตัด ปากคีบ ตะเกียงแอลกอฮอล์
5. วัสดุปลูก ได้แก่ ดิน ทราาย ซีเมนต์แกลบและปุ๋ยสูตร 15-15-15
6. ถ้วยโถก ถูขนาด 6x12 นิ้ว
7. หน่อจันทน์ผาขนาด สูง 10 เซนติเมตร
8. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีอุณหภูมิ 25 ± 1 เซลเซียส ความเข้มแสง 1,500–2,000 ลักซ์ ให้แสง 12 ชั่วโมง/วัน
9. โรงเรือนใช้ตาข่ายพรางแสงชนิด 50 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 ชั้น

วิธีการทดลอง

1. การวางแผนการทดลอง

1.1 การชักนำให้เกิดต้นรวม (Multiple shoot) นำหน่อของจันทน์ผามาเลี้ยงในอาหารสูตรเอ็มเอส ที่มีไอเอเอ ความเข้มข้น 0.00 , 0.10 , 0.50 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ บีเอ เข้มข้น 1.00 , 2.00 , 3.00 และ 4.00 มิลลิกรัม/ลิตร มีทั้งหมด 12 ดำรับการทดลอง มี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขวด

1.2 การชักนำให้เกิดราก โดยใช้ส่วนของต้นที่ได้จากข้อ 1.1 มาเลี้ยงในอาหารเอ็มเอส มีเอ็นเอเอ เข้มข้น 0.10 , 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัม/ลิตร มีทั้งหมด 3 ตำรับการทดลอง แต่ละตำรับการทดลองมี 3 ซ้ำ ที่ละ 20 ขวด

1.3 การนำต้นพืชออกจากขวดเพาะเลี้ยง มาเลี้ยงในวัสดุปลูกสภาพแวดล้อมภายนอก โดยใช้ ดิน : ททราย : ขี้เถ้าแกลบ อัตราส่วน 1 : 1 : 1 จำนวน 200 ต้น เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ศึกษาการมีชีวิตรอด

2. การดำเนินการทดลอง

2.1 ขั้นตอนเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีอยู่ 3 ช่วงคือ ช่วงที่ 1 การชักนำให้เกิดต้นรวม โดยเตรียมอาหารสูตรเอ็มเอส มี ไอเอเอ เข้มข้น 0.00 , 0.10 และ 0.50 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ บีเอ เข้มข้น 1.00 , 2.00 , 3.00 และ 4.00 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ มีทั้งหมด 12 ตำรับการทดลอง แต่ละตำรับการทดลองมี 3 ซ้ำ ที่ละ 10 ขวด ช่วงที่ 2 เตรียมอาหารชักนำให้เกิดราก ใช้สูตรอาหารเอ็มเอส มีเอ็นเอเอ เข้มข้น 0.10 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัม/ลิตร มี 3 ตำรับการทดลอง ตำรับการทดลองละ 3 ซ้ำ ที่ละ 20 ขวด รวมทั้งหมด 180 ขวด ช่วงที่ 3 เตรียมอาหารสูตรเอ็มเอส ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดต้นรวมและเกิดรากที่สมบูรณ์ได้จากผลการทดลอง เพื่อเพิ่มจำนวนของต้นจันทน์ผา ให้ได้ต้นจำนวน 200 ต้น

อาหารที่เตรียมในแต่ละช่วงใส่ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 4 ออนด์ ปิดปากขวดด้วยฝาพลาสติกใสทึบร้อน บรรจุอาหารจำนวน 20 มิลลิลิตร/ขวด นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไออุณหภูมิ 120° เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว นาน 20 นาที ทิ้งไว้ 2 วัน ก่อนนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.2 ขั้นตอนขึ้นพืชและการเลี้ยง นำหน่อที่มีขนาดสูงประมาณ 10 เซนติเมตร มาล้างด้วยน้ำประปาผสมผงซักฟอก ล้างผงซักฟอกออกด้วยน้ำประปา 3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู ตัดใบออกให้เหลือส่วนของยอดและตาบริเวณลำต้น นำชิ้นส่วนพืชที่จะเพาะเลี้ยงจุ่มในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 วินาที ย้ายลงแช่คลอโรกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่มีทวิน 20 อยู่ 1-2 หยด เขย่าเป็นระยะเวลา 15 นาที ล้างคลอโรกซ์ออกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อจำนวน 3 ครั้ง ตัดแต่งเนื้อเยื่อ โดยตัดเนื้อเยื่อลำต้นที่ติดตายอดและตาข้างให้มีขนาด 0.5 เซนติเมตร วางเลี้ยงในอาหารสูตรเอ็มเอสที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกันทั้งหมด 12 ตำรับการทดลอง ใช้ชิ้นส่วนพืช 1 ชิ้น ต่อ 1 ขวด นำขวดที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 25±1 เซลเซียส ความเข้มแสง 1,500-2,000 ลักซ์ ให้แสง 12 ชั่วโมง/วัน ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงแตกต่างกันดังนี้ การชักนำให้เกิดต้นรวมใช้เวลา 12 สัปดาห์ การชักนำให้เกิดรากใช้เวลา 10 สัปดาห์ และช่วงที่เพิ่มจำนวนต้นใช้เวลา 5 เดือน เปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์

2.3 เตรียมวัสดุปลูกประกอบด้วย ดิน : ททราย : ขี้เถ้าแกลบ อัตราส่วน 1 : 1 : 1 บรรจุใน ถ้วยโถกขนาด 250 มิลลิตร จำนวน 200 ใบ นำต้นจันทน์ผาที่สมบูรณ์เต็มทีออกจากขวดเพาะเลี้ยง อย่างระมัดระวัง ล้างรากให้หมด นำต้นลงแช่ในน้ำยาฆ่าเชื้อรา นาน 15 นาที ย้ายลงปลูกในวัสดุ ปลูกที่เตรียมไว้ รดน้ำให้ชุ่มนำมาวางเรียงในเรือนเพาะชำ ที่มีตาข่ายพรางแสงชนิด 50 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 ชั้น รดน้ำทุกวัน วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ย้ายต้นลงเลี้ยงในวัสดุปลูกที่ประกอบ ด้วย ดิน : ททราย : ขี้เถ้าแกลบ อัตราส่วน 1 : 1 : 1 โดยบรรจุลงในขนาด 6x12 นิ้ว รดน้ำทุกวัน วันละ 1 ครั้ง ให้ปุ๋ยสูตร 15 : 15 : 15 ทุก ๆ 15 วัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

3. การเก็บข้อมูล

3.1 การชักนำให้เกิดต้นรวม หลังจากเลี้ยงได้ 12 สัปดาห์ สังเกตการเจริญเติบโต การพัฒนาของเนื้อเยื่อต้นที่กผลและนำชิ้นส่วนที่ช่อกออกมา นับจำนวนต้นรวมที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ในแต่ละดำรับการทดลอง บันทึกผล

3.2 การชักนำให้เกิดรากหลังจากเลี้ยงได้ 10 สัปดาห์ นำต้นออกจากขวดเพาะเลี้ยง นับจำนวนรากที่เจริญมาจากโคนต้นและวัดความยาวราก จากโคนต้นถึงปลายราก

3.3 ศึกษาการมีชีวิตรอดของต้นจันทน์ผาที่นำออกจาก ขวดมาปลูกในวัสดุปลูก สภาพแวดล้อมภายนอก เมื่อมีอายุได้ 8 สัปดาห์ โดยการนับจำนวนต้นที่รอดชีวิต หาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต

4. เวลาและสถานที่

สถานที่ที่ทำการศึกษาได้แก่ อาคารปฏิบัติการเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยี การเกษตร สถาบันราชภัฏสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา

5. ระยะเวลาดำเนินการ

ตั้งแต่วันที่ 10 กุมภาพันธ์ 2540 ถึงวันที่ 14 ธันวาคม 2541