บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์

1. **สารเคมี** ได้แก่ อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร เอ็มเอส (Murashige and Skoog, 1962) สารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ บีเอ (6-benzyladenine) และไอเอเอ (indole-3-acetic acid) โคลชิซิน สารเคมีที่ใช้ในการกำจัดสิ่งปนเปื้อน ได้แก่ แอลกอฮอล์ คลอรอกซ์ ทวีน 20 เบนเลท ผงซักฟอก สารเคมีที่ใช้ในการย้อมเซลล์และโครโมโซม ได้แก่ ซาฟรานิน (safranin) 8-ไฮดรอกซีซิโนลินซัลเฟต (8-hydroxy chinolin sulfat) คาร์ไมน์ กรดน้ำส้ม กรดเกลือ ชีฟรีเอเจนต์ (Schiff's reagent)

2. **เครื่องแก้ว** ได้แก่ ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชปากกว้าง ขนาด 4 ออนด์ พร้อมฝาพลาสติกใสทนร้อน ไวเอล ขนาด 6 แดรม พร้อมฝา สไลด์ กระจกปิดสไลด์ หลอดดูด บีกเกอร์ ขนาดต่างๆ กระบอกตวง ปิเปตต์ ขวดใส่สารเคมีสีชา กรวยแก้ว จานเลี้ยงเชื้อ แท่งแก้วคน

3. **อุปกรณ์ผ่าตัด** ได้แก่ ใบมีดโกน เข็มเขี่ย มีดผ่าตัด ปากคีบ กรรไกรตัดกิ่งไม้

4. **ครุภัณฑ์** ได้แก่ หม้อนึ่งอัดไอ เครื่องวัดความเป็น กรด –ด่าง ตู้อบ เครื่องเขย่า เครื่องกรองแบคทีเรีย เครื่องกลั่นน้ำ แผ่นความร้อน เครื่องชั่งอย่างหยาบ เครื่องชั่งอย่างละเอียด ชนิดจุดทศนิยม 4 ตำแหน่ง กล้องจุลทรรศน์ชนิด 3 ตา ติดอุปกรณ์ถ่ายรูป กล้องถ่ายรูป ไมโครมิเตอร์ ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ

5. **วัสดุเพาะปลูก** ได้แก่ หน้าดิน ขี้เถ้าแกลบ ปุ๋ยเคมี สูตร 15-15-15 ขุยมะพร้าว ถ้วย โค๊ก ถุงเพาะชำสีดำ

6. **ชิ้นส่วนพืช** ได้แก่ ตาข้างและตายอดของคาร์เนชัน

7. **ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช** อุณหภูมิ 25±2 เซลเซียส ความเข้มแสง 1,500-2,000 ลักซ์ ให้แสง 12 ชั่วโมง / วัน

วิธีการทดลอง

1. การวางแผนการทดลอง

1.1 เพิ่มจำนวนต้นของคาร์เนชัน โดยนำตาข้างที่ติดมากับก้านดอกของคาร์เนชันมาเลี้ยงในอาหารเอ็มเอส ที่มีบีเอ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดต้นจำนวนมาก

1.2 การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ โดยศึกษาระดับความเข้มข้นของโคลชิซิน กับความยาวนานในการให้สารโคลชิซินแก่เนื้อเยื่อตายอดและตาข้าง ใช้ความเข้มข้นของโคลชิซิน 0.0 0.1 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงเวลา 24 48 และ 72 ชั่งโมง โดยนำเนื้อเยื่อตายอดและตาข้างที่ได้จากข้อที่ 1.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเอ็มเอส มีบีเอ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของคาร์เนชัน โดยมีความเข้มข้น และ ความยาวนานในการให้สารโคลชิซินแตกต่างกัน ตามที่กำหนด

1.3 ชักนำให้เนื้อเยื่อที่ได้จากการให้สารโคลชิซินเจริญเติบโตเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ โดยนำเนื้อเยื่อที่ผ่านการให้สารโคลชิซินในระดับความเข้มข้นและความยาวนานที่แตกต่างกันมาเลี้ยงในอาหารสูตร เอ็มเอส มี บีเอ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อชักนำให้เกิดต้นจำนวนมาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์ นำต้นที่ได้มาชักนำให้เกิดรากโดยเลี้ยงในอาหารสูตรเอ็มเอส มี ไอเอเอ 0.1 มิลลิกรัม / ลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์

1.4 นำต้นที่ได้มาเลี้ยงในวัสดุปลูกสภาพแวดล้อมภายนอก เป็นเวลา 4 เดือน

2. การดำเนินการทดลอง

2.1 การเตรียมชิ้นส่วนพืช คัดเลือกตายอดและตาข้างของคาร์เนชันที่ติดมากับก้านดอก ตั้งแต่ตาที่ 1- 4 นำมาฟอกทำความสะอาด โดยใช้ผงซักฟอก และล้างด้วยน้ำประปา 3-4 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู ตัดกิ่งออกเป็นท่อน ๆ แต่ละท่อนมีตาติดอยู่ 1 ตา

2.2 การเตรียมอาหาร เตรียมอาหารสูตร เอ็มเอส โดยมี บีเอ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร จำนวน 20 ขวด ขวดละ 20 มิลลิลิตร

2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคาร์เนชัน โดยนำเนื้อเยื่อตายอดและตาข้างมาฟอกฆ่าเชื้อโดยจุ่มในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 วินาที ย้ายมาฟอกในคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่มีทวีน 20 อยู่ 1-2 หยด เป็นเวลา 15 นาที เขย่าเป็นระยะ ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ตัดแต่งเนื้อเยื่อ โดยใช้ตายอดตาข้างวางเลี้ยงในอาหารที่เตรียม

2.4 นำเนื้อเยื่อที่ได้จาก ข้อ 2.3 มาให้สารโคลชิซิน มีวิธีการดังนี้

2.4.1 เตรียมอาหารเหลวสูตร เอ็มเอส มีความเข้มข้นของ บีเอ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับโคลชิซิน เข้มข้น 0.0 0.1 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ มีทั้งหมด 4 สูตร ๆ ละ 2 ขวด ใส่อาหารขวดละ 20 มิลลิลิตร

2.4.2 นำเนื้อเยื่อตายอดของคาร์เนชันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มาวางเลี้ยงในอาหารเหลวที่เตรียมไว้ ใส่ขวดละ 10 ชิ้น

2.4.3 นำขวดเพาะเลี้ยงวางบนเครื่องเขย่า เขย่าเป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง

2.4.4 เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด นำชิ้นส่วนพืชมาล้างในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้ววางเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร เอ็มเอส มี บีเอ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อชักนำให้เกิดต้นจำนวนมาก

2.5 การชักนำให้เกิดต้นที่สมบูรณ์ นำต้นคาร์เนชันที่ผ่านการให้สารโคลชิซินมาชักนำให้เกิดราก โดยเลี้ยงในอาหารเอ็มเอส มี ไอเอเอ 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ในหลอดทดลอง ปิดปากหลอดด้วยสำลี เป็นเวลา 6 สัปดาห์

2.6 นำต้นที่เจริญเติบโตเต็มที่ออกจากหลอดทดลองมาเลี้ยงในวัสดุปลูกสภาพแวดล้อมภายนอก โดยมีวิธีการดังนี้

2.6.1 เตรียมวัสดุปลูก ใช้ หน้าดิน ; ขี้เถ้าแกลบ อัตราส่วน 1 ; 1 ใส่ในถ้วยโค๊ก

2.6.2 ใช้ปากคีบดึงต้นออกจากหลอดทดลอง ล้างวุ้นที่ติดมากับต้นพืชออกให้หมด ด้วยน้ำประปา 3 ครั้ง นำต้นลงแช่ในยาฆ่าเชื้อรา นาน 15 นาที แล้วปลูกในวัสดุที่เตรียมไว้ วางในเรือนเพาะชำ มีตาข่ายพรางแสงชนิด 50 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 ชั้น เป็นเวลา 1 เดือน ให้น้ำทุกวัน วันละ 1 ครั้ง

2.6.3 ย้ายต้นที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้วลงปลูกในวัสดุปลูกที่ประกอบด้วย ดิน ; ขุยมะพร้าว ; ขี้เถ้าแกลบ อัตราส่วน 1 ; 1 ; 1 :ซึ่งบรรจุในถุงเพาะชำ ให้น้ำทุกวัน วันละ 1 ครั้ง ให้ปุ๋ย ทุก 15 วัน เป็นเวลา 4 เดือน

3. การเก็บผล

การเก็บผลแบ่งออกดังนี้

3.1 สังเกตการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อที่ได้รับสารโคลชิซิน ในระดับความเข้มข้นและความยาวนานในการให้สารแตกต่างกันตามที่กำหนด เมื่อเลี้ยงในอาหารเอ็มเอส มี บีเอ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ทุก 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 3 เดือน โดยวัดความสูงของต้น จำนวนต้น และลักษณะของเนื้อเยื่อ

3.2 ศึกษาความแตกต่างของเนื้อเยื่อที่ได้จากต้นคาร์เนชัน เมื่อได้รับสารโคลชิซินที่มีความเข้มข้นและความยาวนานในการให้สารแตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยศึกษาดังนี้

3.2.1 นับจำนวนปากใบบริเวณเนื้อเยื่อบุผิวใบ ด้านหลังใบ และท้องใบ

3.2.2 วัดขนาดของปากใบ โดยวัดความกว้าง และความยาว

3.2.3 วัดขนาดของเซลล์บริเวณเนื้อเยื่อบุผิวใบ ด้านหลังใบและท้องใบ โดยวัดความกว้างและความยาว

3.2.4 นับจำนวนโครโมโซม โดยใช้เนื้อเยื่อปลายยอดของคาร์เนชัน

3.3 ศึกษาการเจริญเติบโตของต้นคาร์เนชันเมื่อเลี้ยงในวัสดุปลูกเป็นเวลา 4 เดือน โดยศึกษาดังนี้

3.3.1 วัดความสูงของต้น

3.3.2 ขนาดของใบ วัดความกว้างและความยาวใบ

3.3.3 ชั่งน้ำหนักใบ

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล โดยการหาค่าเฉลี่ย วิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย

4. เวลาและสถานที่

สถานที่ที่ทำการทดลองได้แก่ อาคารปฏิบัติการเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันราชภัฏสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2544- 1 ตุลาคม 2545