

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์

1. สารเคมี ได้แก่ อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชสูตรเอ็มเอส (Murashige and Skoog, 1962) สารควบคุมการเจริญเติบโต ไอเอเอ (Indole-3-acetic acid) ไอบีเอ (Indole-3-butyric acid) 2,4-ดี (2, 4-Dichlorophenoxy acetic acid) เอ็นเอเอ (α -Naphthalene acetic acid) บีเอ (Benzyladenine) สารเคมีที่ใช้ในการกำจัดสิ่งปนเปื้อน ได้แก่ แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ คลอโรกซ์ ทวิน 20 ยาฆ่าเชื้อรา
2. เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดเพาะเลี้ยงปากกว้างขนาด 4 ลิตร พร้อมฝาพลาสติกใสทนร้อน หลอดทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร ยาว 18 เซนติเมตร บีกเกอร์ขนาดต่างๆ กระบอกตวง ปีเปตต์ ขวดใส่สารเคมีสีขาว กรวยแก้ว จานเลี้ยงเชื้อ
3. ครุภัณฑ์ ได้แก่ ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อชนิดลามินาร์ โฟลคาบินेट (Laminar flow carbinet) หม้อน้ำอัดไอ ลักซ์มิเตอร์ เทอร์โมมิเตอร์ ตู้อบ เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง เครื่องกลั่นน้ำแบบแก้ว เตาความร้อน เครื่องชั่งละเอียด เครื่องชั่งอย่างหยาบ
4. อุปกรณ์ผ่าตัด ได้แก่ มีดผ่าตัด ปากคีบ ตะเกียงแอลกอฮอล์
5. วัสดุเพาะปลูก ได้แก่ หน้ำดิน แกลบ ขุยมะพร้าว ทราย ขี้เถ้าแกลบ ปุ๋ยสูตร 15-15-15
6. ถ้วยโถก ถูดำขนาด 6x12 นิ้ว
7. ชิ้นส่วนพืช ได้แก่ ตาข้างของกิ่งที่ติดมากับก้านดอกคาร์เนชั่น ที่มีวางขายในตลาดขนาดใหญ่ จังหวัดสงขลา เป็นพันธุ์นำเข้ามาจากประเทศมาเลเซีย
8. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีอุณหภูมิ 25 ± 1 เซลเซียส ความเข้มแสง 1,500 - 2,000 ลักซ์ ให้แสงนาน 8 ชั่วโมง/วัน ด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์
9. โรงเรือน ใช้ตาข่ายพรางแสง ชนิด 50 เปอร์เซ็นต์ 1 และ 2 ชั้น

วิธีการทดลอง

1. การวางแผนการทดลอง

1.1 การชักนำให้เกิดต้นรวม (Multiple shoot) โดยใช้ตาข้างของกิ่งคาร์เนชั่น เลี้ยงในอาหารสูตรเอ็มเอส ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต ไอบีเอ ความเข้มข้น 0.00 , 0.01 และ 0.10 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ บีเอ 0.10, 0.50, 1.00 และ 1.50 มิลลิกรัม/ลิตร จัดการทดลองแบบ 3x4

factorial มี 12 ตำรับการทดลอง ใช้แผนการทดลองแบบ CRD. (Completely randomized design) ทำ 3 ซ้ำ แต่ละหน่วยทดลองมี 20 ขวด และแต่ละขวดมี 1 ตา

1.2 การชักนำให้เกิดราก โดยใช้ส่วนของลำต้นที่ได้จากการชักนำให้เกิดต้นรวม มาเลี้ยงในสูตรอาหารเอ็มเอส ที่มีสารออกซิน ต่างกัน 4 ชนิด คือ ไอเอเอ ไอบีเอ เอ็นเอเอ และ 2,4-ดี มีความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับคือ 0.10, 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัม/ลิตร ใช้แผนการทดลองแบบ CRD ทำ 3 ซ้ำ หน่วยทดลองละ 10 ขวด

1.3 การนำต้นพืชออกจากขวดเพาะเลี้ยงมาเลี้ยงในสภาพแวดล้อมภายนอก โดยแบ่งออกเป็น 4 ตำรับการทดลอง ดังนี้

1.3.1 ต้นคาร์เนชันที่ได้รับการกระตุ้นรากในขวดเพาะเลี้ยงที่มีฝาปิดพลาสติก นำมาเลี้ยงในวัสดุปลูกที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

1.3.2 ต้นคาร์เนชันที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดรากในขวดเพาะเลี้ยงที่มีฝาปิดพลาสติก นำมาเลี้ยงในวัสดุปลูกที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

1.3.3 ต้นคาร์เนชันที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดรากในหลอดทดลอง ที่ปิดปากหลอดด้วยสำลี นำมาเลี้ยงในวัสดุปลูกที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

1.3.4 ต้นคาร์เนชันที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดรากในหลอดทดลอง ที่ปิดปากหลอดด้วยสำลี นำมาเลี้ยงในวัสดุปลูกที่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ

มีทั้งหมด 4 ซ้ำ ซ้ำละ 50 ต้น

1.4 ศึกษาการเจริญเติบโตของคาร์เนชันที่ได้จากการทดลอง โดยนำมาเลี้ยงในวัสดุปลูกที่บรรจุในถุงพลาสติก เป็นเวลา 140 วัน แบ่งออกเป็น 3 ตำรับการทดลอง ได้แก่

1.4.1 เลี้ยงในตาข่ายพรางแสง ชนิด 50 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ชั้น

1.4.2 ใช้ตาข่ายพรางแสง ชนิด 50 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 ชั้น

1.4.3 เลี้ยงกลางแจ้ง

มี 4 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ต้น

2. การดำเนินการทดลอง

2.1 ชั้นเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีอยู่ 2 ช่วง คือ ช่วงแรก การชักนำให้เกิดต้นรวม ได้เตรียมสูตรอาหารเอ็มเอส ร่วมกับการใช้ระดับความเข้มข้นของ ไอบีเอ + บีเอ คือ 0.00+0.10, 0.00+0.50 , 0.00+1.00 , 0.00+1.50 , 0.01+0.10 , 0.01+0.50 , 0.01+1.00 , 0.01+1.50 , 0.10+0.10 , 0.10+0.50 , 0.10+1.00 และ 0.10+1.50 มิลลิกรัม/ลิตร โดยกำหนดให้เป็นสูตรที่ 1-12 ตามลำดับ จำนวน 20 ขวดต่อสูตร ขวดละ 20 มิลลิลิตร ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ ช่วงที่ 2 เตรียมอาหารชักนำให้เกิดราก ใช้สูตรอาหารเอ็มเอส ที่มี ไอเอเอ ไอบีเอ เอ็นเอเอ และ 2,4-ดี ความเข้มข้น 0.10 ,

0.50 และ 1.00 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ จำนวน 10 ขวด/สูตร ขวดละ 20 มิลลิลิตร ทำ 3 ซ้ำ ฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เวลา 15-20 นาที

2.2 **ขั้นเตรียมชิ้นส่วนพืชและการเลี้ยง** ในการชักนำให้เกิดต้นรวม ได้นำกิ่งคาร์เนชันมาทำความสะอาดด้วยผงซักฟอก และล้างออกด้วยน้ำประปา 3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู ตัดใบออกให้เหลือแต่กาบใบหุ้มตา ตัดกิ่งออกเป็นท่อน แต่ละท่อนมีตา 1 ตา นับตั้งแต่ตาที่ติดกับก้านดอกลงมาจนถึงตาที่ 4 นำชิ้นส่วนพืชที่ได้จุ่มลงในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ 15 วินาที ฟอกด้วยคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่มีทวิน 20 จำนวน 1-2 หยด เขย่าเป็นระยะ เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบกำหนดใช้ปากคีบดึงเอากาบใบออกให้เหลือตาข้างที่ติดกับกิ่ง นำชิ้นส่วนลงฟอกในคลอรอกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ เวลา 10 นาที แล้วล้างออกในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นตัดแต่งชิ้นส่วนพืชให้ได้ขนาด $\frac{3}{4}$ เซนติเมตร วางลงในขวดอาหารเพื่อชักนำให้เกิดต้นรวมทุกสูตรอาหาร ขวดละ 1 ชิ้น แล้วนำมาเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์

การชักนำให้เกิดราก ใช้ชิ้นส่วนพืชที่ได้จากการชักนำให้เกิดต้นรวมมาเลี้ยงในอาหารสูตรเอ็มเอส ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วจึงตัดชิ้นส่วนของต้นที่ได้ให้ยาว 3 เซนติเมตร วางเลี้ยงในสูตรอาหารต่างๆ ที่ใช้ชักนำให้เกิดราก เป็นเวลา 4 สัปดาห์

การดูแลรักษา นำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไปเลี้ยงในที่อุณหภูมิ 25 ± 1 เซลเซียส ความเข้มแสง 1,500-2,000 ลักซ์ นาน 8 ชั่วโมง/วัน

2.3 **เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสูตรเอ็มเอส** ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตที่สามารถชักนำให้คาร์เนชันเกิดรากได้ดีที่สุด โดยใช้ภาชนะสำหรับเพาะเลี้ยง แตกต่างกัน 2 ชนิด ได้แก่ ใช้ขวดปากกว้างขนาด 4 ออนซ์ ปิดปากขวดด้วยฝาพลาสติกใส และหลอดทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร ยาว 18 เซนติเมตร ปิดปากหลอดด้วยสำลี จำนวน 400 ขวด และ 400 หลอด ตามลำดับ ใส่อาหารในหลอดและในขวดจำนวน 20 มิลลิลิตร/ 1 ขวด หรือ 1 หลอด นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งอัดไอ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 เซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที ทิ้งไว้ 2 วัน ตัดต้นคาร์เนชันยาวประมาณ 2 เซนติเมตร วางเลี้ยงในขวดและในหลอด 1 ต้น/หลอดและต่อขวด เลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อรากงอกเจริญแข็งแรงดี ย้ายต้นพืชออกมาเลี้ยงในสภาพแวดล้อมภายนอก โดยใช้ปากคีบดึงต้นคาร์เนชันออกมาอย่างระมัดระวังไม่ให้ราก ต้น และใบช้ำ ล้างหุ่นออกให้หมดแช่ลงในยาฆ่าเชื้อรา ได้แก่ เบนเลท เป็นเวลา 15 นาที นำต้นลงปลูกในวัสดุปลูก ประกอบด้วยดินร่วน : ไข่ไก่แกลบ อัตราส่วน 3:1 แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่ 1 ใส่ถุงพลาสติกท่อนร้อนปิดปากถุงให้สนิท นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้ไอน้ำร้อน อุณหภูมิ 100 เซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ส่วนที่ 2 ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ บรรจุวัสดุปลูกลงในถ้วยโถกขนาด 150 มิลลิลิตร เเจาะรูที่ก้นภาชนะจำนวน 4-5 รู นำต้นคาร์เนชันลงปลูกในถ้วยโถก ถ้วยละ 1 ต้น รดน้ำให้ชุ่ม นำไปวางไว้ใต้ตาข่ายพรางแสง 1 ชั้น เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ศึกษาการมีชีวิตรอดของต้นคาร์เนชัน

2.4 เพิ่มจำนวนต้นคาร์เนชั่นให้ได้จำนวนมาก ตามวิธีที่สามารถทำให้คาร์เนชั่นรอดชีวิตได้มากที่สุด นำต้นที่ได้จำนวน 120 ต้น เลี้ยงในถุงดำขนาด 10x12 นิ้ว บรรจุวัสดุปลูก ประกอบด้วย ดินร่วน แกลบ ขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1:1:1 ใช้ต้นกล้าที่มีขนาดความสูงประมาณ 5 เซนติเมตร นำไปเลี้ยงในเรือนเพาะชำ มีตาข่ายพรางแสง 2 ชั้น ตาข่ายพรางแสง 1 ชั้น และเลี้ยงกลางแจ้งเป็นเวลา 140 วัน โดยให้น้ำทุกวัน วันละครั้ง ให้น้ำปุ๋ยสูตร 15-15-15 ทุกๆ 15 วัน

3. การเก็บข้อมูล

3.1 การชักนำให้เกิดต้นรวม หลังจากเลี้ยงได้ 8 สัปดาห์ นำชิ้นส่วนที่ได้มานับจำนวนต้นในแต่ละขวด บันทึกผลและสังเกตการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืช

3.2 การชักนำให้เกิดราก หลังเลี้ยงได้ 4 สัปดาห์ จึงนับจำนวนรากที่งอกจากโคนต้น วัดความยาวรากจากโคนต้นถึงปลายรากหาค่าเฉลี่ย และสังเกตการพัฒนาของเนื้อเยื่อในแต่ละสูตรอาหาร

3.3 การนำต้นคาร์เนชั่นออกจากขวดเพาะเลี้ยง มาเลี้ยงในสภาพแวดล้อมภายนอก ศึกษาการมีชีวิตรอด โดยนับจำนวนต้นที่มีชีวิตรอด หาเปอร์เซ็นต์การรอด

3.4 ศึกษาการเจริญเติบโตของคาร์เนชั่น ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ปลูกในเรือนเพาะชำเทศบาลตำบลบ้านพรุ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา โดยวิธีวัดความสูงของต้นจากโคนถึงปลายยอด วัดความยาวของใบ เริ่มจากกาบใบหุ้มตาไปถึงปลายใบ วัดความกว้างของใบ ส่วนที่กว้างที่สุด วัดอุณหภูมิในช่วงเวลา 9.00, 12.00, 15.00 และ 18.00 นาฬิกา 7 วัน/ครั้ง ตั้งแต่วันที่ 26 มกราคม ถึง วันที่ 9 พฤษภาคม 2540 โดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ วัดความเข้มของแสง ในช่วงเวลา 9.00, 12.00, 15.00 และ 18.00 นาฬิกา วัด 7 วัน/ครั้ง ติดต่อกัน ตั้งแต่วันที่ 26 มกราคม ถึง วันที่ 9 พฤษภาคม 2540 โดยใช้ลักซ์มิเตอร์

4. เวลาและสถานที่

สถานที่ที่ทำการขยายพันธุ์พืชโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ อาคารปฏิบัติการเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันราชภัฏสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา ตั้งแต่วันที่ 10 พฤศจิกายน 2537 ถึงวันที่ 26 มกราคม 2540

สถานที่ทำการปลูกคาร์เนชั่นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ เทศบาลตำบลบ้านพรุ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ตั้งแต่วันที่ 26 มกราคม ถึง วันที่ 9 พฤษภาคม 2540 รวมเวลาที่ทำการทดลอง ตั้งแต่วันที่ 10 พฤศจิกายน 2537 ถึง วันที่ 9 พฤษภาคม 2540