

บทที่ 3

ระเบียบวิจัย

อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

3.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์ สำหรับเตรียมอาหาร

- 3.1.1 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
- 3.1.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Analytical balance)
- 3.1.3 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Analytical balance)
- 3.1.4 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance)
- 3.1.5 เครื่องความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- 3.1.6 เตาไฟฟ้า (Hot plate)
- 3.1.7 ข้อนตักสารเคมี
- 3.1.8 ปีกเกอร์ขนาดต่างๆ (Beaker)
- 3.1.9 แท่งแก้วคนสาร
- 3.1.10 กระบอกตวง (Cylinder)
- 3.1.11 ปิเปตต์ (Pipette)
- 3.1.12 ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ขนาด 4 ออนซ์
- 3.1.13 ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ขนาด 8 ออนซ์
- 3.1.14 ข้อนตวง
- 3.1.15 กระบอกฉีดยา ขนาด 1 mL (Syringe)
- 3.1.16 กระบอกฉีดยา ขนาด 10 mL (Syringe)
- 3.1.17 เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)

3.2 เครื่องมือ และอุปกรณ์ สำหรับย้ายตัดเนื้อเยื่อ

- 3.2.1 ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อพืช (Laminar air flow)
- 3.2.2 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.2.3 ขวดแช่เครื่องมือ
- 3.2.4 จานแก้ว
- 3.2.5 เครื่องมือผ่าตัด ด้ามมิดเบอร์ 4 ใบมีดเบอร์ 11 ปากคืบ
- 3.2.6 ชั้นวางหลอดทดลอง
- 3.2.7 ไฟแช็ก
- 3.2.7 กระบอกฉีดแอลกอฮอล์ (Foggy)

3.3 สารเคมี

- 3.3.1 Ammonium nitrate (NH_4NO_3)
- 3.3.2 Calcium chloride ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- 3.3.3 Magnesium sulfate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- 3.3.4 Potassium phosphate (KH_2PO_4)
- 3.3.5 Potassium nitrate (KNO_3)
- 3.3.6 Boric acid (H_3BO_3)
- 3.3.7 Cobalt chloride ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- 3.3.8 Cupric sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- 3.3.9 Ferrous sulfate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- 3.3.10 Manganese sulfate ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
- 3.3.11 Potassium iodide (KI)
- 3.3.12 Sodium molybdate ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- 3.3.13 Zinc sulfate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- 3.3.14 $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 3.3.15 i-Inositol
- 3.3.16 Pyridoxine $\cdot \text{HCl}$
- 3.3.17 Thiamine $\cdot \text{HCl}$ 0.1 mg/l
- 3.3.18 Glycine
- 3.3.19 Sucrose
- 3.3.20 Agar
- 3.3.21 Heiter
- 3.3.22 น้ำยาล้างจาน
- 3.3.23 ปุ๋ย Hydrowork A
- 3.3.24 ปุ๋ย Hydrowork B

3.4 ฮอริโมน

- 3.4.1 6-Benzylaminopurine (BA)
- 3.4.2 Indoleacetic acid (IAA)

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 ศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดจันทน์ผา

วิธีการทดลอง

1. เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS (1962) ปริมาตร 4 L. แบ่งใส่ขวดเพาะเลี้ยงขนาด 4 ออนซ์ ปริมาตร 1/3 ของขวด ให้ได้จำนวน 200 ขวด แล้วนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ โดยตั้งอุณหภูมิที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้วระยะเวลา 15 นาที
2. เตรียมตัวอย่างเมล็ดจันทน์ผาที่เก็บมาได้ทำความสะอาดโดยการล้างด้วยน้ำสะอาดผสมน้ำยาล้างจาน 1-2 หยดในกะละมังที่เตรียมไว้ โดยใช้มือถูให้สะอาดที่ละเมล็ด ประมาณ 50 เมล็ด
3. ใช้ผ้าขาวบางห่อเมล็ดจันทน์ผาเป็นห่อๆ โดยเลือกเมล็ดจันทน์ผาที่สมบูรณ์ จำนวน 9 ห่อ ห่อละ 5 เมล็ด
4. เตรียมน้ำยาฟอกที่ความเข้มข้นต่างๆและน้ำล้างน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อ ดังนี้ คือ
 - 5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 95 ml. + น้ำยาฟอกผ้าขาวไฮเตอร์ 5 ml.
+ น้ำยาล้างจาน 2 หยด จำนวน 3 ขวด
 - 10 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 90 ml. + น้ำยาฟอกผ้าขาวไฮเตอร์ 5 ml.
+ น้ำยาล้างจาน 2 หยด จำนวน 3 ขวด
 - 15 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 85 ml. + น้ำยาฟอกผ้าขาวไฮเตอร์ 5 ml.
+ น้ำยาล้างจาน 2 หยด จำนวน 3 ขวด
 - น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 100 ml. จำนวน 27 ขวด
5. ทำการทดลองฟอกฆ่าเชื้อตัวอย่างเมล็ดจันทน์ผาโดยใช้เวลาที่ต่างกันคือ 5, 10 และ 15 นาที ดังนี้
 - 5.1 ฟอกด้วยน้ำยาฟอกที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วย น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 3 ขวดขวดละ 5 นาที
 - 5.2 ฟอกด้วยน้ำยาฟอกที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วย น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 3 ขวดขวดละ 5 นาที
 - 5.3 ฟอกด้วยน้ำยาฟอกที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วย น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 3 ขวดขวดละ 5 นาที
 - 5.4 ฟอกด้วยน้ำยาฟอกที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วย น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 3 ขวดขวดละ 5 นาที
 - 5.5 ฟอกด้วยน้ำยาฟอกที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วย น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 3 ขวดขวดละ 5 นาที

- 5.6 ฟอกด้วยน้ำยาฟอกที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 3 ขวดขวดละ 5 นาที
- 5.7 ฟอกด้วยน้ำยาฟอกที่ความเข้มข้น 15 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 3 ขวดขวดละ 5 นาที
- 5.8 ฟอกด้วยน้ำยาฟอกที่ความเข้มข้น 15 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 3 ขวดขวดละ 5 นาที
- 5.9 ฟอกด้วยน้ำยาฟอกที่ความเข้มข้น 15 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 3 ขวดขวดละ 5 นาที
6. นำตัวอย่างเมล็ดจันทน์ผาที่ทำการทดลองฟอกฆ่าเชื้อด้วยความเข้มข้นและเวลาต่างๆในข้อที่ 5 เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (1962) อย่างละ 20 ขวด
7. นำขวดเนื้อเยื่อไปเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงประมาณ 2,000-3,000 ลักซ์
8. บันทึกผลการทดลองโดยสังเกตการปนเปื้อนที่เกิดขึ้นเป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วบันทึกผลการทดลอง

3.5.2 ศึกษาหาอัตราการงอกของเมล็ดจันทน์ผาบนอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร Murashige and Skoog (1962)

วิธีการทดลอง

1. เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS (1962) ปริมาตร 1 L. แบ่งใส่ขวดเพาะเลี้ยงขนาด 4 ออนซ์ ปริมาณ 1/3 ของขวด ให้ได้จำนวน 50 ขวด แล้วนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ โดยตั้งอุณหภูมิที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้วระยะเวลา 15 นาที
2. เตรียมตัวอย่างเมล็ดจันทน์ผาที่เก็บมาได้ทำความสะอาดโดยการล้างด้วยน้ำสะอาดผสมน้ำยาล้างจาน 1-2 หยดในกะละมังที่เตรียมไว้ โดยใช้มือถูให้สะอาดที่ละเมล็ด ประมาณ 50 เมล็ด
3. ใช้ผ้าขาวบางห่อเมล็ดจันทน์ผาในข้อที่ 1 จำนวน 2 ห่อ ห่อละ 25 เมล็ด โดยเลือกเมล็ดจันทน์ผาที่สมบูรณ์
4. เตรียมน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซนต์ โดยใช้ น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 95 ml. + น้ำยาฟอกผ้าขาวไฮเตอร์ 5 ml.+ น้ำยาล้างจาน 2 หยด จำนวน 2 ขวดและน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 100 ml. จำนวน 6 ขวด
5. ทำการฟอกฆ่าเชื้อตัวอย่างเมล็ดจันทน์ผาโดยใช้น้ำยาฟอกที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซนต์ เป็นระยะเวลา 10 นาทีทั้ง 2 ห่อ

6. นำตัวอย่างเมล็ดจันทน์ผาที่ทำการทดลองฟอกฆ่าเชื้อด้วยความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 10 นาทีเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (1962) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุดคือ
 - ชุดที่ 1 นำเมล็ดจันทน์ผาที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 10 นาทีเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (1962) จำนวน 20 ขวด
 - ชุดที่ 2 ฝักรูปร่างตามแนวยาวของเอ็มบริโอระวางอย่าให้มีดสัมผัสโดนเอ็มบริโอภายใน เมล็ดจันทน์ผาที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 10 นาที แล้วใช้ปลายมีดนำส่วนของเอ็มบริโอมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (1962) จำนวน 20 ขวด
7. นำขวดเนื้อเยื่อไปเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงประมาณ 2,000-3,000 ลักซ์
8. บันทึกผลการทดลองการเปลี่ยนแปลงการงอกของต้นจันทน์ผาทั้ง 2 ชุดเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

3.5.3 ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำยอดและรากของเนื้อเยื่อจันทน์ผา

1) ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำยอดของเนื้อเยื่อจันทน์ผา

วิธีการทดลอง

1. เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS (1962) ปริมาตร 1 L.
2. เตรียมฮอร์โมน 6-Benzylaminopurine (BA) เข้มข้น 1 mg/10 ml. โดยทำการชั่ง (BA) 0.01 g. ละลายด้วยตัวทำละลายคือ 1N NaOH 1-2 หยด แล้วปรับด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 ml.
3. แบ่งอาหารออกเป็น 5 ส่วน ส่วนละ 200 ml. ใส่ฮอร์โมนที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนี้คือ
 - ส่วนที่ 1 อาหารสูตร MS (1962) ปริมาตร 200 ml. ไม่เติมฮอร์โมน 6-Benzylaminopurine (BA)
 - ส่วนที่ 2 อาหารสูตร MS (1962) ปริมาตร 200 ml. เติมฮอร์โมน 6-Benzylaminopurine (BA) ปริมาตร 10 ml.
 - ส่วนที่ 3 อาหารสูตร MS (1962) ปริมาตร 200 ml. เติมฮอร์โมน 6-Benzylaminopurine (BA) ปริมาตร 20 ml.
 - ส่วนที่ 4 อาหารสูตร MS (1962) ปริมาตร 200 ml. เติมฮอร์โมน 6-Benzylaminopurine (BA) ปริมาตร 30 ml.
 - ส่วนที่ 5 อาหารสูตร MS (1962) ปริมาตร 200 ml. เติมฮอร์โมน

6-Benzylaaminopurine (BA) ปริมาตร 40 ml.

4. เทอาหารใส่ขวดเพาะเลี้ยงขนาด 4 ออนซ์ ปริมาณ 1/3 ของขวด ให้ได้จำนวน 20 ขวด ในแต่ละสูตร
5. นำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ โดยตั้งอุณหภูมิที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้วระยะเวลา 15 นาที
6. นำเนื้อเยื่อจันทน์ผาที่ได้จากการทดลองที่ 2 มาเลี้ยงบนอาหารแต่ละสูตรที่ทำเตรียม ข้างต้นโดยทำการตัด ตามขวางของลำต้นจันทน์ผาให้มีความหนาประมาณ 2 mm. แล้ว นำเนื้อเยื่อมาเลี้ยงตรงกลางอาหารแต่ละสูตร
7. นำขวดเนื้อเยื่อไปเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นแสงประมาณ 2,000-3,000 ลักซ์
8. บันทึกผลการทดลองการเปลี่ยนแปลงการงอกยอดของต้นจันทน์ผาเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

2) ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำรากของเนื้อเยื่อจันทน์ผา

1. เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS (1962) ปริมาตร 1 L.
2. เตรียมฮอร์โมน Indoleacetic acid (IAA) เข้มข้น 1 mg./10 ml. โดยทำการชั่ง (IAA) 0.01 g. ละลายด้วยตัวทำละลายคือ 1N NaOH 1-2 หยด แล้วปรับด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 ml.
3. แบ่งอาหารออกเป็น 5 ส่วน ส่วนละ 200 ml. ใส่ฮอร์โมนที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนี้คือ
 - ส่วนที่ 1 อาหารสูตร MS (1962) ปริมาตร 200 ml. ไม่เติมฮอร์โมน Indoleacetic acid (IAA)
 - ส่วนที่ 2 อาหารสูตร MS (1962) ปริมาตร 200 ml. เติมฮอร์โมน Indoleacetic acid (IAA) ปริมาตร 10 ml.
 - ส่วนที่ 3 อาหารสูตร MS (1962) ปริมาตร 200 ml. เติมฮอร์โมน Indoleacetic acid (IAA) ปริมาตร 20 ml.
 - ส่วนที่ 4 อาหารสูตร MS (1962) ปริมาตร 200 ml. เติมฮอร์โมน Indoleacetic acid (IAA) ปริมาตร 30 ml.
 - ส่วนที่ 5 อาหารสูตร MS (1962) ปริมาตร 200 ml. เติมฮอร์โมน Indoleacetic acid (IAA) ปริมาตร 40 ml.

4. เทอาหารใส่ขวดเพาะเลี้ยงขนาด 4 ออนซ์ ปริมาณ 1/3 ของขวด ให้ได้จำนวน 20 ขวดแต่ละสูตร
5. นำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ โดยตั้งอุณหภูมิที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที
6. นำเนื้อเยื่อยอดจันทน์ผาที่ได้จากการทดลองที่ 3 ข้างต้นมาเลี้ยงบนอาหารแต่ละสูตรที่ทำเตรียมข้างต้น โดยทำการตัดยอดออกเป็นยอดๆ ให้แต่ละยอดมีความสูงประมาณ 1-2 cm. แล้วนำเนื้อเยื่อมาเลี้ยงตรงกลางอาหารแต่ละสูตร
7. นำขวดเนื้อเยื่อไปเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงประมาณ 2,000-3,000 ลักซ์
8. บันทึกผลการทดลองการเปลี่ยนแปลงการงอกยอดของต้นจันทน์ผาเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

3.5.4 ศึกษาอัตราการเจริญของชิ้นส่วนยอดและรากของต้นจันทน์ผา เปรียบเทียบในอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962) กับสูตรอาหารอย่างง่าย กิตติศักดิ์ (2558)

วิธีการทดลอง

1) ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำยอดของเนื้อเยื่อจันทน์ผา

1. เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออย่างง่ายสูตร กิตติศักดิ์(2558) ปริมาตร 1 L.
2. เตรียมฮอร์โมน 6-Benzylaminopurine (BA) เข้มข้น 1 mg./10 ml. โดยทำการชั่ง (BA) 0.01 g. ละลายด้วยตัวทำละลายคือ 1N NaOH 1-2 หยด แล้วปรับด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 ml.
3. แบ่งอาหารออกเป็น 5 ส่วน ส่วนละ 200 ml. ใส่ฮอร์โมนที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตรดังนี้คือ

ส่วนที่ 1 อาหารสูตร กิตติศักดิ์(2558) ปริมาตร 200 ml. ไม่เติมฮอร์โมน 6-Benzylaminopurine (BA)

ส่วนที่ 2 อาหารสูตร กิตติศักดิ์(2558) ปริมาตร 200 ml. เติมฮอร์โมน 6-Benzylaminopurine (BA) ปริมาตร 10 ml.

ส่วนที่ 3 อาหารสูตร กิตติศักดิ์(2558) ปริมาตร 200 ml. เติมฮอร์โมน 6-Benzylaminopurine (BA) ปริมาตร 20 ml.

ส่วนที่ 4 อาหารสูตร กิตติศักดิ์(2558) ปริมาตร 200 ml. เติมฮอร์โมน

6-Benzylaaminopurine (BA) ปริมาตร 30 ml.

ส่วนที่ 5 อาหารสูตร กิตติศักดิ์(2558) ปริมาตร 200 ml. เติมหอร์โมน

6-Benzylaaminopurine (BA) ปริมาตร 40 ml.

4. เทอาหารใส่ขวดเพาะเลี้ยงขนาด 4 ออนซ์ ปริมาณ 1/3 ของขวด ให้ได้จำนวน 20 ขวด
แต่ละสูตร

5. นำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ โดยตั้งอุณหภูมิที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นระยะเวลา 15 นาที

6. นำเนื้อเยื่อจันทน์ผาที่ได้จากการทดลองที่ 2 มาเลี้ยงบนอาหารแต่ละสูตรที่ทำเตรียม
ข้างต้นโดยทำการตัดตามขวางของลำต้นจันทน์ผาให้มีความหนาประมาณ 2 mm. แล้ว
นำเนื้อเยื่อมาเลี้ยงตรงกลางอาหารแต่ละสูตร

7. นำขวดเนื้อเยื่อไปเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส
ความเข้มแสงประมาณ 2,000-3,000 ลักซ์

8. บันทึกผลการทดลองการเปลี่ยนแปลงการงอกยอดของต้นจันทน์ผาเป็นระยะเวลา
4 สัปดาห์

2) ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำรากของเนื้อเยื่อจันทน์ผา

1. เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร กิตติศักดิ์(2558) ปริมาตร 1 L.

2. เตรียมฮอร์โมน Indoleacetic acid (IAA) เข้มข้น 1 mg./10 ml. โดยทำการชั่ง (IAA)
0.01 g. ละลายด้วยตัวทำละลายคือ 1N NaOH 1-2 หยด แล้วปรับด้วยน้ำกลั่นให้เป็น
100 ml.

3. แบ่งอาหารออกเป็น 5 ส่วน ส่วนละ 200 ml. ใส่ฮอร์โมนความเข้มข้น 0, 1, 2, 3 และ 4
มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนี้คือ

ส่วนที่ 1 อาหารสูตร กิตติศักดิ์(2558) ปริมาตร 200 ml. ไม่เติมหอร์โมน
Indoleacetic acid (IAA)

ส่วนที่ 2 อาหารสูตร กิตติศักดิ์(2558) ปริมาตร 200 ml. เติมหอร์โมน
Indoleacetic acid (IAA) ปริมาตร 10 ml.

ส่วนที่ 3 อาหารสูตร กิตติศักดิ์(2558) ปริมาตร 200 ml. เติมหอร์โมน
Indoleacetic acid (IAA) ปริมาตร 20 ml.

ส่วนที่ 4 อาหารสูตร กิตติศักดิ์(2558) ปริมาตร 200 ml. เติมหอร์โมน
Indoleacetic acid (IAA) ปริมาตร 30 ml.

ส่วนที่ 5 อาหารสูตร กิตติศักดิ์(2558) ปริมาตร 200 ml. เติมหอร์โมน

Indoleacetic acid (IAA) ปริมาตร 40 ml.

4. เทอาหารใส่ขวดเพาะเลี้ยงขนาด 4 ออนซ์ ปริมาณ 1/3 ของขวด ให้ได้จำนวน 20 ขวด
แต่ละสูตร
5. นำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ โดยตั้งอุณหภูมิที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที
6. นำเนื้อเยื่อยอดจันทน์ผาที่ได้จากการทดลองที่ 3 ข้างต้นมาเลี้ยงบนอาหารแต่ละสูตรที่ทำเตรียมข้างต้นโดยทำการตัดยอดออกเป็นยอดๆ ให้แต่ละยอดมีความสูงประมาณ 1-2 cm. แล้วนำเนื้อเยื่อมาเลี้ยงตรงกลางอาหารแต่ละสูตร
7. นำขวดเนื้อเยื่อไปเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นแสงประมาณ 2,000-3,000 ลักซ์
8. บันทึกผลการทดลองการเปลี่ยนแปลงการงอกยอดของต้นจันทน์ผาเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

3.5.5 ทดลองนำต้นจันทน์ผาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชออกปลูกลงกระเบเพาะปลูก วิธีการทดลอง

1. นำต้นอ่อนจันทน์ผาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีสภาพต้นที่แข็งแรงและสมบูรณ์มาคลายเกลียวผาขวดเป็นเวลา 1-2 วัน
2. มอสแห้งมาล้างด้วยน้ำนำประปาให้สะอาด 3 ครั้งแล้วแช่ไว้ในน้ำประมาณ 3 ชั่วโมงเพื่อให้มอสแห้งชุ่มน้ำ
3. จากนั้นนำต้นจันทน์ผาที่คลายเกลียวผาไว้ในข้อที่ 1 มาล้างเอาฝุ่นออกจากรากให้หมดและนำมาปลูกในถาดเพาะชำที่มีมอสที่เตรียมไว้ในข้อที่ 2 อยู่
4. ใส่ปุ๋ยออสโมโคส 3 เม็ด จากนั้นบรรจุลงในถุงพลาสติกใสคลุมไว้โดยใช้หนังยางมัดปากถุงเพื่อรักษาความชื้น
5. นำต้นจันทน์ผาไปวางไว้ในที่มีแสงรำไรเพื่อปรับสภาพเป็นเวลา 5 วัน
6. เมื่อครบกำหนดเวลา 5 วันเจาะรูที่ถุงพลาสติกใสแล้วทิ้งไว้ 5 วัน
7. เมื่อครบ 5 วันก็ทำการเปิดปากถุงพลาสติกแล้วทิ้งไว้อีก 5 วัน
8. นำต้นจันทน์ผาที่รอดชีวิตไปปลูกในกระถางที่มีดินปลูก
9. บันทึกอัตราการรอดชีวิตของต้นจันทน์ผาเป็นเวลา 4 สัปดาห์