

บทที่ 3

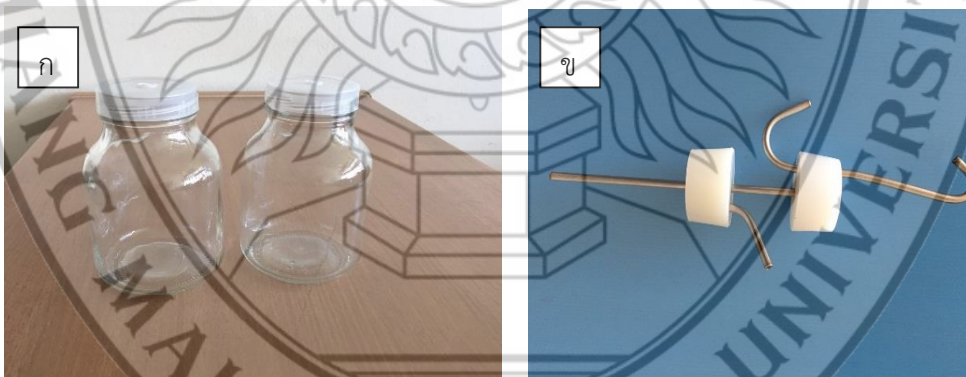
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างทดลอง

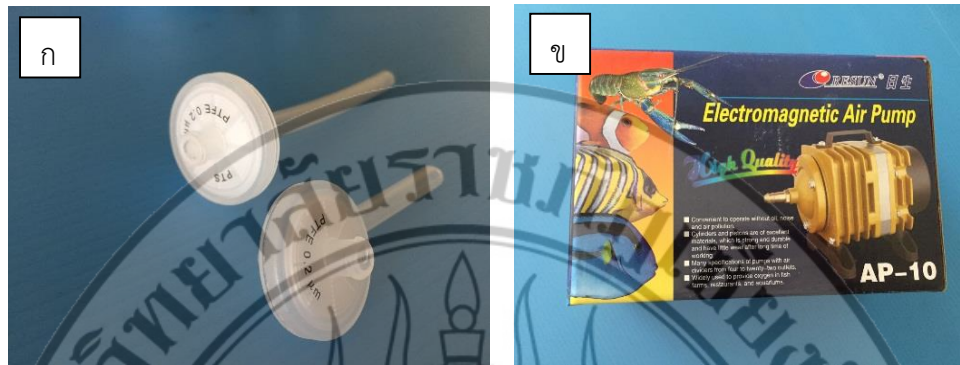
ต้นหญ้าหวาน จาก อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่

3.2 ระบบจุ่มแช่ชั่วคราว (TIB)

- 1) ขวดแฉกขนาด 500 มิลลิลิตร 15 ขวด (ดังภาพ 3.1 (ก))
- 2) ท่อลมสแตนเลสพร้อมจุกซิลิโคน (ทนความร้อนได้) (ดังภาพ 3.1 (ข))
- 3) ฟิวเตอร์ขนาด 0.2 ไมครอน พร้อมสายสิริโคน (ดังภาพ 3.2 (ก))
- 4) แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์
- 5) เครื่องปั๊มลม (ดังภาพ 3.2 (ข))
- 6) สายยางใส (ดังภาพ 3.3 (ก))
- 7) เครื่องตั้งเวลา (Timer) (ดังภาพ 3.3 (ข))



ภาพ 3.1 (ก) ขวดแฉกขนาด 500 มิลลิลิตร (ข) ท่อลมสแตนเลสพร้อมจุกซิลิโคน



ภาพ 3.2 (ก) พิวเตอร์ขนาด 0.2 ไมครอน และสายซิลิโคน ยาว 3 นิ้ว (ข) เครื่องปั๊มลม



ภาพ 3.3 (ก) สายยางซิลิโคน (ข) Digital Timer

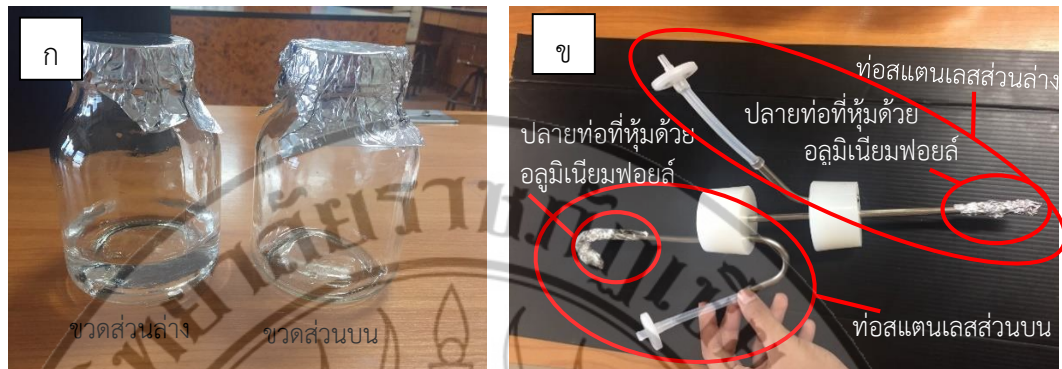
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนหญ้าหวาน

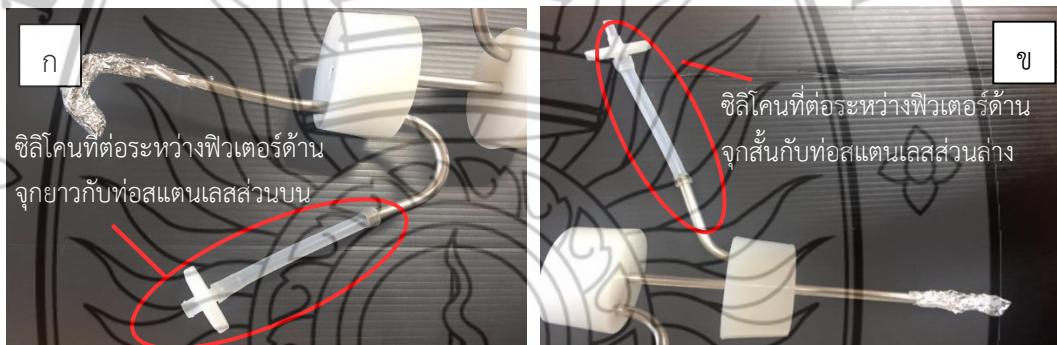
- 1) นำชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานมาล้างด้วยน้ำยาล้างจาน 1 หยดล้าง 1 รอบให้สะอาด
- 2) นำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อหญ้าหวานมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 1 ครั้ง
- 3) ทำการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ (Mercury Chloride ; HgCl_2) ความเข้มข้น 0.1%(w/v) เป็นเวลา 3 นาที
- 4) ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วอีก 3 รอบ
- 5) นำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อมาตัดบริเวณที่ถูกสารฆ่าเชื้อทำลายออก แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม Kinetin ความเข้มข้น 3 mg/L นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

3.2.2 ขั้นตอนการเตรียมและติดตั้งระบบจุ่มแช่ชั่วคราว

- 1) นำขวดแก้วขนาด 500 mL ส่วนบน (ที่ใส่เนื้อเยื่อหญ้าหวานแล้ว) และขวดส่วนล่างที่ใส่อาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 3 mg/L แล้วหุ้มฝาขวดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ ดังภาพ 3.4 (ก) แล้วใส่ถุงพลาสติกนำไปฆ่าเชื้อที่หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศา ความดัน 15 ปอนด์ เวลา 15 นาที ดังภาพ 3.6 (ก)
- 2) ท่อสแตนเลสพร้อมจุกซิลิโคนต่อกับฟิวเตอร์จุกด้านยาวไว้ในส่วนของท่อสแตนเลสส่วนบน ดังภาพ 3.5 (ก) และต่อฟิวเตอร์จุกด้านสั้นกับท่อสแตนเลสส่วนล่าง ดังภาพ 3.5 (ข) และใช้อลูมิเนียมฟอยล์หุ้มฟิวเตอร์ ดังภาพ 3.4 (ข) แล้วนำใส่ถุงพลาสติกนำไปฆ่าเชื้อที่หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศา ความดัน 15 ปอนด์ เวลา 15 นาที ดังภาพ 3.6 (ก)
- 2) นำไปอบที่ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศา 6 ชม.
- 3) นำขวดแผ่นส่วนบน (ที่ใส่เนื้อเยื่อหญ้าหวานแล้ว) และขวดส่วนล่าง (ที่ใส่อาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 3 mg/L) ต่อกันโดยใช้ท่อสแตนเลสและจุกซิลิโคน ดังภาพ 3.6 (1),(3) และ (4) (ตั้งแต่ขั้นตอนนี้ทำในตู้ ลามินา)
- 4) นำสายซิลิโคนที่ต่อกับฟิวเตอร์แล้ว ต่อกับเครื่องปั๊มลม ดังภาพ 3.6 (6) โดยกำหนดการปั๊มลมด้วยการตั้งเวลาในเครื่อง Digital Timer อัตโนมัติตามเวลาที่กำหนด ดังภาพ 3.6 (8) (ขั้นตอนนี้ทำในชั้นวางเนื้อเยื่อพืช) ก็จะได้ระบบจุ่มแช่ชั่วคราวที่สมบูรณ์ ดังภาพ 3.8



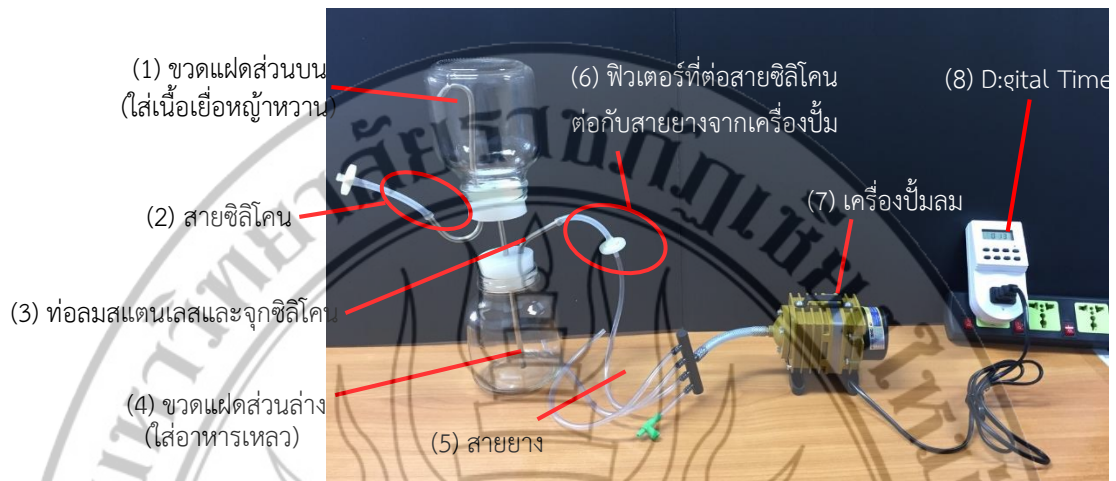
ภาพ 3.4 (ก) ขวดที่เตรียมใส่เนื้อเยื่อพืชส่วนบน 1 ขวด และขวดส่วนล่างที่ใส่อาหารเหลว (ข) ท่อสแตนเลสพร้อมจุกซิลิโคนที่ต่อกับฟิวเตอร์ขนาด 0.2 ไมครอน และท่อหุ้มปลายท่อสแตนเลสด้วยอลูมิเนียมฟอยล์



ภาพ 3.5 (ก) ท่อสแตนเลสส่วนบนที่ใช้ต่อสายซิลิโคนและกับฟิวเตอร์ด้านจุกยาว (ข) ท่อสแตนเลสส่วนล่างที่ใช้ต่อกับสายซิลิโคนกับฟิวเตอร์ด้านจุกสั้น เพื่อจะใช้ต่อกับสายยางเชื่อมกับปั๊มลม



ภาพ 3.6 (ก) ส่วนท่อสแตนเลสพร้อมจุกซิลิโคนที่ต่อกับสายซิลิโคนและฟิวเตอร์ขนาด 0.2 ไมครอนที่ใส่ถุงพลาสติกเตรียมนำไปฆ่าเชื้อที่หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศา ความดัน 15 ปอนด์ เวลา 15 นาที (ข) ขวดแผลดส่วนที่ใช้ใส่เนื้อเยื่อและส่วนที่ใส่อาหารเหลวแล้วนำไปใส่ถุงพลาสติกเตรียมนำไปฆ่าเชื้อที่หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศา ความดัน 15



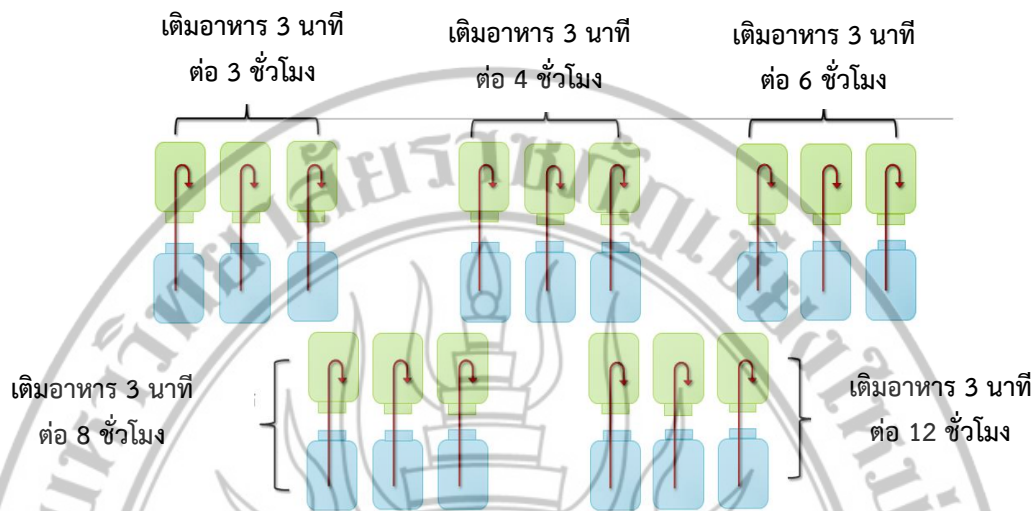
ภาพ 3.7 ระบบจุ่มแช่ชั่วคราว



ภาพ 3.8 ระบบจุ่มแช่ชั่วคราวที่เสร็จสมบูรณ์แล้ว

3.2.3 การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของความถี่ในการให้อาหารต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนหน่อหว้าหวานในระบบแช่ชั่วคราว

ตัดชิ้นส่วนข้อของหน่อหว้าหวานให้มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร จำนวน 15 เนื้อเยื่อ ต่อที่ 1 ชุดการทดลอง โดยจะแช่น้ำหนักสดของเนื้อเยื่อที่ละเนื้อเยื่อก่อนจะนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติม Kinetin 3 mg/l โดยกำหนดเวลาในการเติมอาหารเหลวแบ่งเป็น 5 ชุดการทดลอง คือ 3 นาทีต่อ 3, 4, 6, 8 และ 12 ชั่วโมงตามลำดับ ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ชิ้นเนื้อเยื่อ ดังภาพ 3.8 เมื่อครบ 4 สัปดาห์ นำเนื้อเยื่อออกมาชั่งน้ำหนักสด และนำไปอบที่ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 35 องศา เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมาชั่งน้ำหนักแห้ง



ภาพ 3.8 การกำหนดเวลาในการเติมอาหารในแต่ละชุดการทดลอง

3.2.3 การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของระยะเวลาในการให้อาหารต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนหญ้าหวานในระบบแช่ชั่วคราว

นำต้นอ่อนหญ้าหวานจำนวน 10 ต้น มาเลี้ยงในระบบแช่ชั่วคราวโดยใช้อาหารเหลวสูตร MS ที่เติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เป็น 5.8 ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในภาชนะขนาด 500 มิลลิลิตร โดยให้อาหารในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน คือ 1, 5 และ 10 นาทีต่อครั้ง โดยใช้ความถี่ในการให้อาหารที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 ทำการทดลองชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ บันทึกจำนวนยอด ลักษณะของต้นอ่อนที่ได้ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในสภาพให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส บันทึกน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของชิ้นส่วนหญ้าหวาน ก่อนและหลังการทดลอง

3.2.4 การทดลองที่ 3 การศึกษาสถานะของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนหญ้าหวาน

นำต้นอ่อนหญ้าหวานมาเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 5 เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าความเร็ว 80 รอบต่อนาที และการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น (เติมผลวุ้น 7 กรัมต่อลิตร) ทำการทดลองชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ บันทึกจำนวนยอด ลักษณะของต้นอ่อนที่ได้ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในสภาพให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส บันทึกน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของชิ้นส่วนหญ้าหวาน ก่อนและหลังการทดลอง

3.2.5 วิธีการวิเคราะห์ผล

การทดลองทั้งหมดวางแผนการทดลองแบบ CRD โดยแสดงผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย จากนั้นวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

