# บทที่ 3

## วิธีดำเนินการศึกษา

**วิธีดำเนินการศึกษา**

การศึกษาการขยายพันธุ์พังกาหัวสุมดอกแดงในงานวิจัยนี้มี 2 วิธีด้วยกัน คือ การปักชำฝักในกระบะทราย และการเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดแก้ว

1. <u>การทดลองปักชำฝักพังกาหัวสุมดอกแดงในกระบะทดลอง</u>

1.1) การเตรียมท่อนชำ นำฝักที่จะใช้ในการปักชำซึ่งมีความยาวเฉลี่ย 15.2 $\pm$ 0.4 เซนติเมตร น้ำหนักเฉลี่ย 24.5 $\pm$ 0.1 กรัม มาตัดแบ่งเป็น 2 ท่อน ให้มีความยาวเท่าๆกัน

1.2) การเตรียมสารควบคุมการเจริญของพืช เตรียมสารละลายIBA และ NAA ที่มีความเข้มข้น 6 ระดับ คือ 0, 10, 100, 1000, 5000 และ 10000 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 1 ลิตร

1.3) แบ่งท่อนชำออกเป็นท่อนยอดและท่อนโคนอย่างละ 12 กลุ่มๆละ 16 ท่อน เพื่อจุ่มด้านโคนของท่อนชำลงในสารละลายสารควบคุมการเจริญทั้ง 2 ชนิดที่เตรียมไว้อย่างละ 6 ระดับความเข้มข้น ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การจุ่ม จุ่มให้เปียกโคนท่อนชำราว 1-1.5 เซนติเมตร (ดูตารางที่ 2)

1.4) การเตรียมกระบะปักชำ ทำความสะอาดกระบะด้านในโดยรอบ นำทรายใส่ลงในกระบะให้ทรายมีระดับสูง 20 เซนติเมตร แล้วรดน้ำให้ชุ่ม ใช้ไม้ไผ่ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับท่อนชำ ปักนำเพื่อให้เกิดหลุมลึก 4 เซนติเมตร ใช้ระยะห่างระหว่างหลุม 5 เซนติเมตร เพื่อปักชำท่อนชำทั้งท่อนยอดและท่อนโคนอย่างละ 4 ท่อน สลับกันในทุกการทดลอง วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ 2 x 6 Factorials ในแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design ดูแผนการทดลองในรูปที่ 3

ตารางที่ 2 การทดลองเพื่อศึกษาผลของการใช้สารควบคุมการเจริญ IBA และ NAA ที่มีต่อการเกิดรากของฝักพังกาหัวสุมดอกแดงท่อนยอด และท่อนโคน

| การทดลองที่ | สารเร่งราก | ท่อนชำ | ความเข้มข้น (มก.ต่อลิตร) |
|---|---|---|---|
| $H_1C_1$ | IBA | ท่อนยอด | 0 |
| $H_1C_2$ | | | 10 |
| $H_1C_3$ | | | 100 |
| $H_1C_4$ | | | 1000 |
| $H_1C_5$ | | | 5000 |
| $H_1C_6$ | | | 10000 |
| $H_1C_1$ | | ท่อนโคน | 0 |
| $H_1C_2$ | | | 10 |
| $H_1C_3$ | | | 100 |
| $H_1C_4$ | | | 1000 |
| $H_1C_5$ | | | 5000 |
| $H_1C_6$ | | | 10000 |
| $H_2C_1$ | NAA | ท่อนยอด | 0 |
| $H_2C_2$ | | | 10 |
| $H_2C_3$ | | | 100 |
| $H_2C_4$ | | | 1000 |
| $H_2C_5$ | | | 5000 |
| $H_2C_6$ | | | 10000 |
| $H_2C_1$ | | ท่อนโคน | 0 |
| $H_2C_2$ | | | 10 |
| $HC_3$ | | | 100 |
| $H_2C_4$ | | | 1000 |
| $H_2C_5$ | | | 5000 |
| $H_2C_6$ | | | 10000 |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| $H_1C_4$ | $H_2C_1$ | $H_1C_2$ | $H_1C_6$ | $H_2C_3$ | $H_2C_4$ |
| $H_2C_2$ | $H_2C_6$ | $H_1C_3$ | $H_2C_5$ | $H_1C_5$ | $H_1C_1$ |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| $H_1C_6$ | $H_1C_4$ | $H_1C_5$ | $H_2C_1$ | $H_1C_2$ | $H_2C_2$ |
| $H_2C_3$ | $H_1C_1$ | $H_2C_5$ | $H_1C_3$ | $H_2C_6$ | $H_2C_4$ |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| $H_2C_2$ | $H_2C_4$ | $H_1C_5$ | $H_2C_3$ | $H_1C_1$ | $H_1C_4$ |
| $H_1C_3$ | $H_2C_6$ | $H_2C_5$ | $H_2C_1$ | $H_1C_6$ | $H_1C_2$ |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| $H_2C_1$ | $H_1C_3$ | $H_1C_4$ | $H_1C_1$ | $H_2C_3$ | $H_2C_4$ |
| $H_1C_6$ | $H_1C_2$ | $H_1C_5$ | $H_2C_6$ | $H_2C_3$ | $H_2C_6$ |

รูปที่ 3 การวางแผนการทดลองการปักชำฝักพังกาหัวสุมดอกแดงแบบ Randomized Complete Block Design

หมายเหตุ: $C_1$ = ระดับความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร

$C_2$ = ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

$C_3$ = ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

$C_4$ = ระดับความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร

$C_5$ = ระดับความเข้มข้น 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร

$C_6$ = ระดับความเข้มข้น 10000 มิลลิกรัมต่อลิตร

$H_1$ = IBA และ $H_2$ = NAA

1.5) การดูแลรักษาระหว่างการปักชำ การปักชำอยู่ภายใต้หลังคาโรงเรือนที่มุงด้วย saran 70 เปอร์เซนต์ ทำการรดน้ำให้โชกเป็นประจำในตอนเช้าและเย็นตลอดเวลา 12 สัปดาห์โดยระวังไม่ให้น้ำท่วมขัง

สถานที่ เรือนเพาะชำ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ

เวลา ซ้ำที่ 1 เริ่มปักชำ : วันที่ 15 ตุลาคม พ.ศ. 2537

สิ้นสุด : วันที่ 15 มกราคม พ.ศ. 2538

ซ้ำที่ 2 เริ่มปักชำ : วันที่ 25 มีนาคม พ.ศ. 2538

สิ้นสุด : วันที่ 25 มิถุนายน พ.ศ. 2538

ซ้ำที่ 3 เริ่มปักชำ : วันที่ 12 พฤษภาคม พ.ศ. 2538

สิ้นสุด : วันที่ 12 สิงหาคม พ.ศ. 2538

1.6) การศึกษาผลการทดลอง ตรวจดูการเจริญของรากเมื่อปักชำไปแล้วเป็นเวลา 2, 4, 8 และ 12 สัปดาห์โดยเก็บผลจากท่อนชำทีละ Block แต่ละการทดลองมีท่อนยอด และท่อนโคนอย่างละ 4 ท่อน บันทึกจำนวนรากวัดความยาวรากของแต่ละท่อน หาค่าเฉลี่ยของความยาวรากและจำนวนรากของแต่ละท่อนเพื่อเปรียบเทียบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดใดและที่ระดับความเข้มข้นเท่าใดมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้ท่อนชำพังกาหัวสุมดอกแดงออกรากได้ดีที่สุดวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม A Statistic Analysis System (SAS) เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย Duncan's New Multiple Range Test และ T-test สำหรับเปรียบเทียบผลของสารควบคุมการเจริญทั้ง 2 ชนิดในท่อนยอดกับท่อนโคน แล้วสรุปวิจารณ์ผล

2. <u>การศึกษาเทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดแก้ว</u>

2.1) การทดลองหาวิธีฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของพังกาหัวสุมดอกแดง

เก็บส่วนต่างๆ ของพังกาหัวสุมดอกแดงขณะติดอยู่บนต้นในป่าชายเลนธรรมชาติ จากจังหวัดระยอง ใส่ถุงพลาสติกที่สะอาดเก็บบรรจุลงกล่องโฟม เมื่อเดินทางกลับมาถึงห้องปฏิบัติการ ใช้ระยะเวลาประมาณ 3 ชั่วโมงในการเดินทางจากระยองถึงห้องปฏิบัติการ ให้นำชิ้นเนื้อเยื่อต่างๆ ของพังกาหัวสุมดอกแดงไปเลี้ยงในหลอดแก้ว โดยทดลองนำชิ้นส่วนต่างๆ ของพืช ได้แก่ ปลายยอด, ใบ, ฐานรองดอก, ฝักอ่อน (ฝักยังอยู่ใน calyx), ฝักแก่ (เปลือกมีสีเขียวเข้มอมแดง) มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำผสม Teepol หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำให้สะอาด ถ้าไม่สามารถนำเนื้อเยื่อทั้งหมดที่เก็บมาเลี้ยงในหลอดแก้วได้ สามารถเก็บเนื้อเยื่อฝักอ่อนและฝักแก่ไว้ในกล่องโฟมที่สะอาดปิดฝาให้สนิทเพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำ โดยเนื้อเยื่อฝักอ่อนสามารถเก็บไว้ได้ประมาณ 2 วัน ส่วนฝักแก่สามารถเก็บไว้ได้ประมาณ 1 สัปดาห์ แต่เนื้อเยื่อส่วนอื่นๆ ต้องนำเข้าห้องปฏิบัติการเพื่อฟอกฆ่าเชื้อไปทันที

การนำเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของพังกาหัวสุมดอกแดงไปเลี้ยงในหลอดแก้ว โดยทดลองนำชิ้นส่วนต่างๆ ของพืช ได้แก่ ปลายยอด, ใบ, ฐานรองดอก, ฝักอ่อน (ฝักยังอยู่ใน calyx), ฝักแก่ (เปลือกมีสีเขียวเข้มอมแดง) ทดลองฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยวิธีต่างๆ (ดูตารางที่ 3) ก่อนนำไปทดลองเลี้ยงด้วยอาหารสูตร MS ในหลอดแก้ว เพื่อหาส่วนของพืชที่เหมาะสมในการนำไปชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากต่อไป

- ปลายยอดที่นำมาเลี้ยงในหลอดแก้วตัดให้มีความยาว 1.5 เซนติเมตร
- ใบที่นำมาเลี้ยงในหลอดแก้ว ตัดใบให้มีขนาด 1 x 1 ตารางเซนติเมตร
- ฐานรองดอกตัดให้มีความหนาประมาณ 0.2 มิลลิเมตร
- ส่วนฝักอ่อนผ่าแบ่งครึ่งตามยาวของฝัก

- ฝักแก่ตัดฝักออกเป็นท่อนๆ แต่ละท่อนมีความยาว 1.5 เซนติเมตร โดยวางแต่ละท่อนให้ด้านโคนสัมผัสกับอาหาร แล้วนำไปทดลองเลี้ยงด้วยอาหารสูตร MS ในหลอดแก้ว สังเกตการเปลี่ยนแปลงทุกๆ สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ตารางที่ 3 การทดลองฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของพังกาหัวสุมดอกแดงด้วยวิธีต่างๆ กัน

| การทดลองที่ | วิธีฟอกฆ่าเชื้อ |
|---|---|
| 1 | นำชิ้นส่วนของพืชล้างด้วยน้ำให้สะอาดจุ่มลงในเอทธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์ เป็นเวลาครึ่งนาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายคลอรีอกซ์ 5 เปอร์เซนต์ ที่เติม Tween 20 ปริมาณ 1-2 หยด เป็นเวลา 10 นาที เขย่าเป็นระยะๆ หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง จากนั้นใช้เทคนิคปลอดเชื้อตัดเฉพาะส่วนที่ต้องการ นำไปเลี้ยงบนอาหารที่เตรียมไว้ |
| 2 | นำชิ้นส่วนของพืชล้างด้วยน้ำให้สะอาดแล้วจุ่มลงในเอทธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์ ครึ่งนาทีจากนั้นฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายคลอรีอกซ์ 10 เปอร์เซนต์ ที่เติม Tween 20 ปริมาณ 1-2 หยด เป็นเวลา 15 นาที เขย่าเป็นระยะๆ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง จากนั้นใช้เทคนิคปลอดเชื้อตัดเฉพาะส่วนที่ต้องการ นำไปเลี้ยงบนอาหารที่เตรียมไว้ |
| 3 | นำชิ้นส่วนของพืชล้างด้วยน้ำให้สะอาด แล้วจุ่มในเอทธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซนต์ แล้วผ่านไฟ หลังจากนั้นฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายคลอรีอกซ์ 30 เปอร์เซนต์ ที่เติม Tween 20 ปริมาณ 1-2 หยด เป็นเวลา 30 นาที เขย่าเป็นระยะๆ หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง จากนั้นใช้เทคนิคปลอดเชื้อตัดเฉพาะส่วนที่ต้องการนำไปเลี้ยงบนอาหารที่เตรียมไว้ |

หมายเหตุ สังเกตุการเปลี่ยนแปลงโดยดูอัตราการปนเปื้อนที่เกิดขึ้นจากเชื้อราหรือแบคทีเรีย และอัตราการรอดชีวิตเมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 4

2.2) ชนิดและการใช้สารลดปริมาณสารสีน้ำตาลที่พืชสร้างขึ้นในหลอดแก้ว

การทดลองใช้สารลดปริมาณสารสีน้ำตาลจากชิ้นพืชในหลอดแก้ว ร่วมกับวิธีการเปลี่ยนอาหารทุก 2 วัน นำฝักแก่มาตัดครึ่งแล้วฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยวิธีที่ 3 (ตารางที่ 3) นำไปทดลองตามตารางที่4 อาหารที่ใช้คือสูตร MS สังเกตการเปลี่ยนแปลงเป็นเวลา 2 สัปดาห์

ตารางที่ 4 ชนิดและการใช้สารลดปริมาณสารสีน้ำตาลที่พืชสร้างขึ้นในหลอดแก้ว

| การทดลองที่ | ชนิดและการใช้สารลดปริมาณสารสีน้ำตาลที่พืชสร้างขึ้นในหลอดแก้ว |
|---|---|
| 1 | ตัดชิ้นเนื้อเยื่อพืช ภายใต้สารละลาย ascorbic acid ที่ระดับความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และเปลี่ยนอาหารทุก 2 วัน |
| 2 | เติม activated charcoal 0.5 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารกึ่งแข็ง MS และเปลี่ยนอาหารทุก 2 วัน |
| 3 | เติม activated charcoal 1.0 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารกึ่งแข็ง MS และเปลี่ยนอาหารทุก 2 วัน |
| 4 | เติม polyvinylpyrolidone(PVP) 1.0 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารกึ่งแข็ง MS และเปลี่ยนอาหารทุก 2 วัน |
| 5 | เติม polyvinylpyrolidone(PVP) 3.0 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารกึ่งแข็ง MS และเปลี่ยนอาหารทุก 2 วัน |

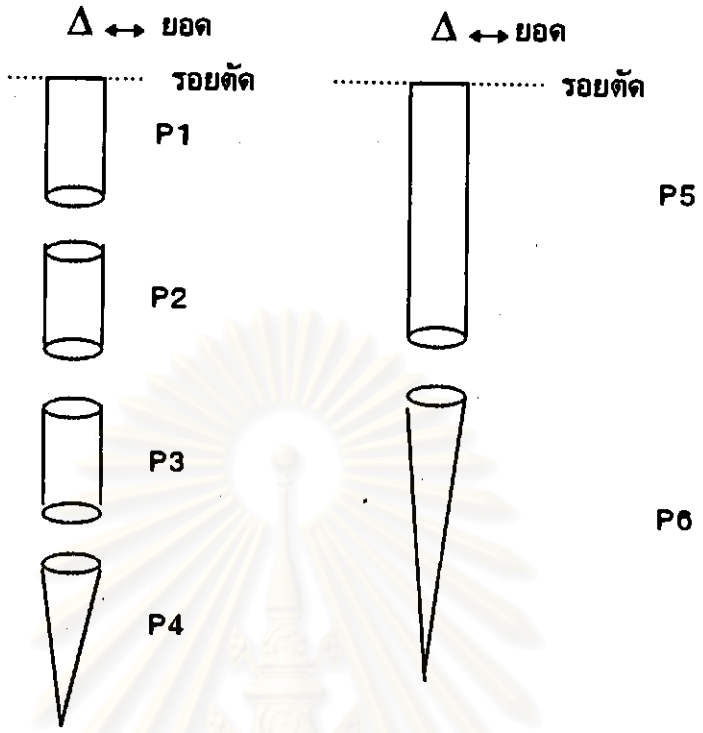
2.3) การทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อฝักแก่ของพังกาหัวสุมดอกแดงเพื่อชักนำให้เกิดยอดในหลอดแก้ว

นำฝักแก่พังกาหัวสุมดอกแดงมาล้างทำความสะอาดผิวภายนอกด้วยน้ำยา teepole และล้างน้ำจนสะอาด จุ่มใน 95 เปอร์เซนต์แอลกอฮอล์แล้วผ่านไฟ หลังจากนั้นแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ 30 เปอร์เซนต์ผสม Tween-20 2-3 หยด เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำฝักมาตัดออกเป็นท่อนๆ ให้มีความยาว 3 และ 6 เซนติเมตร ดังรูปที่ 4 หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อของฝักที่ตัดไว้ทั้ง 2 ขนาดไปเลี้ยงบนอาหาร 5 ชนิด ตามตารางที่ 5 โดยเสียบด้านโคนลงในอาหารขวดละ 1 ชิ้น ทำการทดลองอย่างละ 50 ขวด เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อให้ความเข้มแสงประมาณ 3000 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลอง

สำหรับการทดลองที่ 1-3 (ตารางที่ 5) รักษาระดับน้ำกลั่นและสารละลายภายในขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อฝักให้มีระดับสูงกว่าทรายประมาณ 0.5 เซนติเมตรตลอดการทดลอง โดยเติมน้ำกลั่นและสารละลายอาหารเป็นระยะๆ สำหรับการทดลองที่ 4 และ 5 (ตารางที่ 5) ทำการย้ายอาหารทุก 3 วัน ใน 3 สัปดาห์แรกและทุกๆ สัปดาห์หลังจากนั้น สังเกตและบันทึกผลการเจริญเปลี่ยนแปลงของการเกิดยอดเป็นเวลา 6 เดือน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย






รูปที่ 4 ชิ้นเนื้อเยื่อฝักแก่พังกาหัวสุมดอกแดงขนาดต่างๆที่ใช้เลี้ยงในหลอดแก้ว
หมายเหตุ P1, P2, P3, P4 ยาวท่อนละ 3 เซนติเมตร P5, P6 ยาวท่อนละ 6 เซนติเมตร (ท่อน P1 และ P5 ตัดยอดทิ้งก่อนนำไปเลี้ยงในหลอดแก้ว)

ตารางที่ 5 สูตรอาหารสังเคราะห์แบบต่างๆ ที่ใช้ในการชักนำให้เกิดยอดจากเนื้อเยื่อส่วนฝัก

| การทดลองที่ | อาหารที่ใช้เลี้ยงพังกาหัวสุมดอกแดงในหลอดแก้ว |
|---|---|
| 1 | น้ำกลั่น + ทราย |
| 2 | MS + ทราย |
| 3 | WPM + ทราย |
| 4 | MS + agar |
| 5 | WPM + agar |

2.4) การทดลองเพื่อชักนำให้ยอดเกิดรากในหลอดแก้ว

นำยอดที่ได้จากการทดลองที่ 2.3 มาตัดให้มีความยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร มาเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ ที่ดัดแปลงโดยเติมออกซินชนิดต่างๆ ได้แก่ IBA และ 2,4-D ร่วมกับไซโตไคนิน คือ BAP 3 ระดับความเข้มข้น ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การทดลองสูตรอาหารต่างๆ เพื่อชักนำให้ยอดเกิดรากในหลอดแก้ว รวม 72 การทดลอง

| สูตรอาหาร | การทดลองที่ | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ไซโตไคนิน / ออกซิน | | BAP(มก./ล.) | |
| | | | 0 | 5 | 10 |
| MS | IBA(มก.ต่อลิตร) | 0 | 1 | 2 | 3 |
| | | 5 | 4 | 5 | 6 |
| | | 10 | 7 | 8 | 9 |
| | 2,4-D(มก.ต่อลิตร) | 0 | 10 | 11 | 12 |
| | | 5 | 13 | 14 | 15 |
| | | 10 | 16 | 17 | 18 |
| 1/2MS | IBA(มก.ต่อลิตร) | 0 | 19 | 20 | 21 |
| | | 5 | 22 | 23 | 24 |
| | | 10 | 25 | 26 | 27 |
| | 2,4-D(มก.ลิตร) | 0 | 28 | 29 | 30 |
| | | 5 | 31 | 32 | 33 |
| | | 10 | 34 | 35 | 36 |
| WPM | IBA(มก.ต่อลิตร) | 0 | 37 | 38 | 39 |
| | | 5 | 40 | 41 | 42 |
| | | 10 | 43 | 44 | 45 |
| | 2,4-D(มก.ต่อลิตร) | 0 | 46 | 47 | 48 |
| | | 5 | 49 | 50 | 51 |
| | | 10 | 52 | 53 | 54 |
| 1/2 WPM | IBA(มก.ต่อลิตร) | 0 | 55 | 56 | 57 |
| | | 5 | 58 | 59 | 60 |
| | | 10 | 61 | 62 | 63 |
| | 2,4-D(มก.ต่อลิตร) | 0 | 64 | 65 | 66 |
| | | 5 | 67 | 68 | 69 |
| | | 10 | 70 | 71 | 72 |