บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ อุปกรณ์

1. วัสดุพืช

1.1 การศึกษาชักนำตายอดรวม

ในการศึกษานี้ใช้ต้นผักเหลียงที่ได้จากการปักชำอายุ 1-2 ปีในสวนของเกษตรกร อำเภอหลังสวน จังหวัดชุมพร ซึ่งปลูกในดินผสมใส่ถุงพลาสติก รดน้ำทุกวัน วันละ 1 ครั้ง ให้ปุ๋ยละลายช้า 4 เดือนต่อครั้ง พร้อมกับรดสารละลายอาหารสูตร MS ที่ลดองค์ประกอบลงสามในสี่ ทุก 1 สัปดาห์ เมื่อต้องการปริมาณยอดจำนวนมาก เพื่อใช้ในการทดลอง ฉีดไทโอยูเรียความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ก่อนเป็นเวลา 1 สัปดาห์

1.2 การศึกษาการเพิ่มปริมาณและการยืดยาวของยอด

ใช้ตายอดที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ และลำต้นอ่อนบนอาหารสูตร MS เติม TDZ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±3 องศาเซลเซียส ในสภาพความเข้มแสง 900 ลักซ์ ย้ายเลี้ยงทุก 2 เดือนในอาหารใหม่สูตรเดิม

1.3 การชักนำราก

ใช้ยอดที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงตายอดดังกล่าวข้างต้นบนอาหารเหลวหรือแข็งสูตร MS เติม TDZ ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±3 องศาเซลเซียส ในสภาพความเข้มแสง 1000 ลักซ์ ย้ายเลี้ยงทุก 2 เดือน

2. อุปกรณ์ในการทดลอง

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- สารเคมีที่ใช้เตรียมธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรองของอาหารสูตร MS WPM และ SH (รายละเอียดในตารางภาคผนวก)
- สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินคือ 2,4-D และ NAA และกลุ่มไซโทไคนินคือ BA และ TDZ

2.2. อุปกรณ์การทดลอง

- เครื่องแก้ว ประกอบด้วยปิเปต กระบอกตวง ขวดปรับปริมาตร บีกเกอร์ ขวดเพาะเลี้ยง
- อุปกรณ์ในการย้ายเลี้ยง ประกอบด้วยปากคีบ ด้ามมีดและใบมีดผ่าตัด กระดาษชำระ แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์ ตู้ย้ายเลี้ยง
- อุปกรณ์ในการเตรียมอาหาร ประกอบด้วยเครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ตู้อบแห้งและอบฆ่าเชื้อ
- อุปกรณ์อื่นๆ กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ พร้อมชุดบันทึกภาพ

วิธีการ

1. อิทธิพลของชนิดชิ้นส่วนพืช และสูตรอาหารต่อการพัฒนาของตายอด

นำชิ้นส่วนยอดอ่อนอายุประมาณ 1 สัปดาห์จากกิ่งปักชำ มาล้างด้วยน้ำประปา ฟอกฆ่าเชื้อโดยการจุ่มแช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ 30 วินาที แช่นในสารละลายคลอร็อกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสมทวีน 20 1-2 หยด เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนยอดอ่อนที่ได้ตัดแยกเป็น 3 ชิ้นส่วนคือ ชิ้นส่วนใบตัดตามขวางขนาด 0.5 ×0.5 เซนติเมตร ปลายยอดยาว 1-2 เซนติเมตร และลำต้นอ่อนตัดเป็นท่อนยาว 0.5 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงในอาหาร 3 สูตรคือ MS WPM และ SH แต่ละสูตรเติม IBA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับBAP (benzylaminopurine) 1.53 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±3 องศาเซลเซียสในสภาพความเข้มแสง 900 ลักซ์ ตรวจสอบอัตราการสร้างตายอดรวม จำนวนตายอด และลักษณะตายอดหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ เปรียบเทียบกันระหว่างชิ้นส่วนพืชและสูตรอาหารที่เพาะเลี้ยง โดยใช้แผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ใน factorial แต่ละหน่วยทดลองย่อย (treatment combination) ทำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขวด (ขวดละ 4 ชิ้น) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

1.1 การตรวจสอบอัตราการสร้างตายอดรวม โดยการนับจำนวนชิ้นส่วนพืชที่สร้างตายอดรวมและจำนวนชิ้นส่วนพืชเพาะเลี้ยงทั้งหมด แล้วนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ดังนี้

$$\text{อัตราการสร้างตายอดรวม (\%)} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนพืชที่สร้างตายอดรวม}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนพืชเพาะเลี้ยงทั้งหมด}} \times 100$$

1.2 การตรวจสอบจำนวนตายอด โดยการนับจำนวนตายอดบนชิ้นส่วนพืชและจำนวนชิ้นส่วนพืชที่สร้างตายอดรวม แล้วนำมาคำนวณดังนี้

$$\text{จำนวนตายอด (ตายอด/ชิ้นส่วนพืชที่สร้าง)} = \frac{\text{จำนวนตายอดบนชิ้นส่วนพืช}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนพืชที่สร้างตายอดรวม}}$$

2. อิทธิพลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาของตายอด

นำชิ้นส่วนที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1 มาฟอกฆ่าเชื้อ ตัดชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 1 เติม TDZ 0.25 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ BA 0.5 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 2,4-D 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ NAA 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว เปรียบเทียบกับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมจากการ

ทดลองที่ 1 หลังจากเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±3 องศาเซลเซียส ในสภาพความเข้มแสง 900 ลักซ์ เป็นเวลา 2 เดือน ตรวจสอบอัตราการสร้างตายอดรวมและจำนวนตายอด เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD ใน factorial แต่ละหน่วยการทดลองทำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขวด (ขวดละ 4 ชิ้น) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

3. อิทธิพลการวางชิ้นส่วนพืช และการสร้างแผลต่อการพัฒนาของตายอด

นำชิ้นส่วนใบ และลำต้นอ่อนจากกิ่งปักชำภายนอกหลอดทดลอง มาฟอกฆ่าเชื้อ สร้างแผลโดยการตัดชิ้นส่วนใบออกเป็น 3 ส่วนคือ โคนใบ กลางใบ และปลายใบ และเพาะเลี้ยงทั้งใบ ร่วมกับการวางหลังใบและท้องใบสัมผัสอาหาร นอกจากนี้เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติม TDZ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงในสภาพนิ่ง และเขย่าเลี้ยง ในกรณีของลำต้นตัดเป็นท่อนและผ่าซีกร่วมกับการวางราบและวางปักลงบนอาหารแข็งเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมจากการศึกษาที่ 1 และ 2 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±3 องศาเซลเซียส ในสภาพความเข้มข้นแสง 900 ลักซ์ ตรวจสอบอัตราการสร้างตายอดรวม จำนวนตายอด และลักษณะยอดหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน เปรียบเทียบกันในแต่ละลักษณะการสร้างแผล และตำแหน่งการวางเลี้ยงแยกกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD ในแต่ละหน่วยการทดลองทำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขวด (ขวดละ 4 ชิ้น) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

4. อิทธิพลของความเข้มข้นของ TDZ และชนิดอาหารต่อการเพิ่มปริมาณและยืดยาวของยอด

นำตายอดที่ได้จากชิ้นส่วนใบ และลำต้นในการศึกษาที่ 2 และ 3 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ชนิดต่างๆ กันคือ อาหารแข็ง อาหารเหลว และอาหารแข็งร่วมกับอาหารเหลว เติม TDZ ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±3 องศาเซลเซียส ในสภาพความเข้มแสง 1000 ลักซ์ ตรวจสอบจำนวนยอด และวัดความยาวของยอด โดยวัดจากโคนยอดจนถึงลีฟไพรโมเดีย หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน

5. อิทธิพลขององค์ประกอบของอาหารสูตร MS ผงถ่าน และความเข้มข้นของ IBA ต่อการเกิดราก

ตัดแยกยอดที่ได้จากการศึกษาที่ 3 4 และ 5 กรีดโคนของยอด 2-3 รอย จุ่มในสารละลาย IBA 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 15 นาที ซึ่งวิธีการนี้ประสบผลสำเร็จในการชักนำรากมังคุด (Te-chato and Lim, 1999) แล้วปักชำลงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่ลดและลดองค์ประกอบลงมาสามในสี่ส่วน (¾ MS) ครึ่งหนึ่ง (½ MS) และหนึ่งในสี่ส่วน (¼ MS) เติม IBA 0 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้เติมและไม่เติมผงถ่าน 0.25 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 14 ชั่วโมงต่อ

วัน หรือในที่มืดเป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเกิด จำนวนและความยาวของราก หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน เปรียบเทียบกันระหว่างปัจจัยองค์ประกอบของอาหาร ความเข้มข้นของ IBA และความเข้มแสงโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD ใน factorial แต่ละหน่วยทดลองทำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขวด (ขวดละ 4 ชิ้น) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT