บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

วัสดุพืช

1. การศึกษาการชักนำแคลลัส

ใช้ใบอ่อนของปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนราจากสถานีวิจัยเทพา และวิทยาลัยเกษตรกรรมและเทคโนโลยีตรัง อายุ 10-20 ปี ที่มีการบันทึกประวัติการให้ผลผลิต โดยมีผลผลิตเฉลี่ยประมาณ 4 ตัน/ไร่/ปี มาฟอกฆ่าเชื้อโดยแช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 45 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด จากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ตัดให้มีขนาด 5x5 มิลลิเมตร เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS เติมสารควบคุมชนิดต่างๆ ในที่มืด อุณหภูมิ 28$\pm$0.5 องศาเซลเซียส

2. การศึกษาการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

ใช้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 1 ปี บนอาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ความเข้มแสง 1300 ลักซ์ อุณหภูมิ 26$\pm$4 องศาเซลเซียส ย้ายเลี้ยงทุกๆ 6 สัปดาห์ในอาหารสูตรเดิม

3. การศึกษาการเจริญของโซมาติกเอ็มบริโอ

ใช้โซมาติกเอ็มบริโอในระยะรูปกลม (globular shape) และสร้างจาว (haustorium shape) ชักนำการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอดังกล่าวโดย นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน อายุ 1 ปี มาเพาะเลี้ยงอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มแสง 1300 ลักซ์ อุณหภูมิ 26$\pm$4 เป็นเวลา 4 เดือน โดยย้ายเลี้ยงทุกๆ 1 เดือน

อุปกรณ์ในการทดลอง

1. **สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง**

- สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบสูตรอาหาร MS และสูตรเพาะเลี้ยงปาล์มน้ำมัน (รายละเอียดในตารางภาคผนวก)
- น้ำตาลซูโครส PVP (Polyvinylpyrrolidone) เคซีนไฮโดรไลเสท และกรดแอสคอร์บิค
- สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D, dicamba (3,6-Dichloro-2-methoxybenzoic acid) NAA, picloram (Picolinic acid ethyl ester) , BA

2. **อุปกรณ์การทดลอง**

- เครื่องแก้วประกอบด้วยฟลาสก์ ปิเปต กระบอกตวง volumetric flask จานเพาะเลี้ยง
- อุปกรณ์ในการย้ายเลี้ยง ประกอบด้วยปากคีบ ด้ามมีดและใบมีดผ่าตัด กระดาษชำระ พาราฟิล์ม แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์ ตู้ย้ายเลี้ยง ตู้เพาะเลี้ยงควบคุมอุณหภูมิ
- อุปกรณ์ในการเตรียมอาหาร ประกอบด้วยเครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง เครื่องวัด pH หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ตู้อบแห้งและอบฆ่าเชื้อ ตู้เย็น เครื่องกรองมิลลิพอร์ และกระดาษกรองมิลลิพอร์ขนาดช่อง 45 ไมโครเมตร

วิธีการศึกษา

1. ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต และอุณหภูมิที่ใช้เพาะเลี้ยงต่อการชักนำแคลลัสจากใบอ่อนปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดี

นำใบอ่อนที่ยังไม่คลี่ให้เห็น ทางใบที่ 6-8 ของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดีอายุ 10 ปี จากสถานีวิจัยเทพา คณะทรัพยากรธรรมชาติ (ต้นที่ 1) มาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารโซเดียมไฮโปคลอ-ไรท์เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ วางบนเครื่องเขย่าแบบหมุนวนความเร็ว 120 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อจำนวน 3 ครั้ง แล้วตัดใบอ่อนปาล์มน้ำมันให้มีขนาด 5x5 มิลลิเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม NAA หรือ dicamba หรือ 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับการเติมกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรดด่าง 5.7 ในสภาพมืดที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 2 ระดับคือ 28$\pm$0.5 และ 26$\pm$4 องศาเซลเซียส บันทึกเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสและรากต่อจำนวนใบอ่อนทั้งหมดหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน

2. ผลของตำแหน่งทางใบ และสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงต่อการชักนำแคลลัสจากใบอ่อนปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดี

นำใบอ่อนจากทางใบที่ 6-8 และ 9-11 (นับจากยอดที่ใบยังไม่คลี่) ของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดีอายุ 10 ปี จากสถานีวิจัยเทพา คณะทรัพยากรธรรมชาติ (ต้นที่ 2) มาฟอกฆ่าเชื้อตามวิธีการศึกษาที่ 1 แล้วตัดใบอ่อนปาล์มน้ำมันให้มีขนาดประมาณ 5x 5 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และสูตรเพาะเลี้ยงปาล์มน้ำมัน ที่รายงานโดย Avril และคณะ (1986) เติมน้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 นอกจากนี้ยังศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตอีก 1 ชนิดคือ picloram นำมาเลี้ยงในสภาพมืดที่อุณหภูมิ 28$\pm$0.5 องศาเซลเซียส บันทึกเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสและรากหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน

3. ผลของสารแอนติออกซิแดนท์ และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสจากใบอ่อนปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดี

ศึกษาผลของการเติมสารแอนติออกแดนท์ 2 ชนิดคือ PVP และกรดแอสคอร์บิคต่อการสร้างแคลลัสของปาล์มน้ำมัน โดยนำใบอ่อนที่ยังไม่คลี่ทางใบที่ 6-8 ของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดีอายุ 20 ปี จากวิทยาลัยเกษตรกรรมและเทคโนโลยีจังหวัดตรัง นำมาฟอกฆ่าเชื้อตามวิธี

ข้างต้น จากนั้นตัดให้มีขนาดประมาณ 5x5 มิลลิเมตร นำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D หรือ dicamba เข้มข้น 1, 2.5 และ 5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับการเติม PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัม/ลิตร หรือ กรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงในสภาพมืดที่อุณหภูมิ 28±0.5 องศาเซลเซียส บันทึกเปอร์เซ็นต์และจำนวนการสร้างแคลลัสและรากหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน

4. ผลของความเข้มของ dicamba ต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

แคลลัสเริ่มแรกที่ได้จากการเลี้ยงใบอ่อนที่ยังไม่คลี่ของต้นกล้าปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตดีบนอาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1, 2.5 และ 5 มิลลิกรัม/ลิตร กรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับการเติมหรือไม่เติมเคซีนไฮโดรไลเสทเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร แต่ละความเข้มข้นเติมกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±4 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง 1300 ลักซ์ ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในแต่ละความเข้มข้นของ dicamba หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน

5. ศึกษาการเจริญของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 1 ปี ในอาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ย้ายเลี้ยงทุก 6 สัปดาห์ มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิกรัม/ลิตร กรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร เติมหรือไม่เติมเคซีนไฮโดรไลเสทเข้มข้น 1000 มิลลิกรัม/ลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับการเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27±3 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ 16 ชั่วโมง/วัน บันทึกอัตราการเจริญของแคลลัสในแต่ละความเข้มข้นของ dicamba โดยการชั่งน้ำหนักแคลลัสหลังจากเลี้ยงทุกๆ 15 วัน เป็นเวลา 3 เดือน

6. ผลของระยะเอ็มบริโอที่เหมาะสมต่อการเจริญของโซมาติกเอ็มบริโอ

ในการศึกษานี้ชักนำการพัฒนาโซมาติกเอ็มบริโอจาก 2 ระยะ คือระยะรูปกลมและระยะสร้างจาว โซมาติกเอ็มบริโอดังกล่าวชักนำโดย นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 1 ปี บนอาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น

1 มิลลิกรัม/ลิตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 เดือน โดยย้ายเลี้ยงทุก 1 เดือน หลังจากนั้นแบ่งโซมาติกเอ็มบริโอในระยะรูปกลม หรือสร้างจาว มาเพาะเลี้ยงในอาหาร 2 ชั้น โดยชั้นล่างเป็นอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ผงถ่าน 0.25 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เติมอาหารเหลวชั้นบนสูตรเดียวกันแต่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง เติม NAA เข้มข้น 0.06 มิลลิกรัม/ลิตร และ BA เข้มข้น 0.03 มิลลิกรัม/ลิตร บันทึกเปอร์เซ็นต์การพัฒนาของยอดจากโซมาติกเอ็มบริโอทั้ง 2 ระยะ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน