บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาการขยายพันธุ์โกงกางใบเล็กในครั้งนี้มี 2 วิธีคือ

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ
2. การปักชำในสภาพธรรมชาติ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ :

นำเนื้อเยื่อพืชจากส่วนต่าง ๆ ของโกงกางใบเล็กเช่น เอมบริโอ, ไฮโปคอทิล, ยอด, ข้อและใบ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ชนิดต่าง ๆ ที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ทั้งในกลุ่มออกซินและไซโตไคนิน เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสหรือต้นอ่อน จากนั้นพัฒนาให้เป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ต่อไป

1. การเตรียมพืชทดลอง

1.1 การเพาะเลี้ยงยอด (shoot-tip meristem) และข้อ

การศึกษาครั้งนี้ใช้ยอดจากต้นโกงกางซึ่งปลูกเลี้ยงไว้ในกระบะทรายที่เรือนเพาะชำภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยคัดเลือกยอดที่สมบูรณ์และมีกาบใบห่อหุ้มอยู่ ตัดยอดให้มีใบที่คลี่แล้วติดมาด้วย 1 คู่ ปลิดใบออกให้หมด ล้างทำความสะอาดผิวภายนอกด้วยน้ำกรอง ตัดแบ่งเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนยอดและข้อ นำมาฆ่าเชื้อที่ผิวภายใต้สภาพปลอดเชื้อ โดยแช่ในethanol 70% นาน 3 นาที จากนั้นแช่ในสารละลาย Ca (OCl_2) ที่มีความเข้มข้น 15% ผสม Tween-20 2-3 หยด เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที

ใช้มีดผ่าตัดที่ฆ่าเชื้อแล้วลอกกาบใบออก จนได้ส่วนของยอดอ่อน (shoot - tip meristem) ซึ่งประกอบด้วยหน่วยเติบโตของยอดและใบอ่อน (leaf primordia) 1 คู่ นำส่วนยอดอ่อนไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ชนิดต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ (ตารางที่ 4) โดยเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพ

ปลอดเชื้อ จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปเก็บไว้ในที่มืดนาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงย้ายไปเก็บในสภาพที่มีความเข้มของแสงประมาณ 3,000 ลักซ์ ให้ได้รับแสงนาน 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ย้ายเนื้อเยื่อไปเลี้ยงบนอาหารใหม่ทุก 3 วัน สังเกตความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

สำหรับส่วนข้อ ทดลองเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์เช่นเดียวกับส่วนยอดอ่อน

ภาพที่ 4 : ยอดโกงกางใบเล็กที่สมบูรณ์และมีกาบใบห่อหุ้มอยู่

ภาพที่ 5 : โกงกางใบเล็ก (*Rhizophora apiculata* Blume.) ที่ปลูกในกระบะทราย เรือนเพาะชำ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

1.2 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อส่วนฝัก และใบ

นำฝักโกงกางใบเล็กและใบคู่ที่ 1 หรือ 2 มาล้างทำความสะอาดผิวภายนอกด้วยน้ำกรอง แล้วตัดฝักออกเป็นท่อน ๆ ยาวประมาณท่อนละ 0.5, 1 และ 2 เซนติเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวภายให้สภาพปลอดเชื้อ โดยแช่ในสารละลาย Ca (OCl_2) ที่มีความเข้มข้น 20% ผสม Tween-20 2-3 หยด เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที

ตัดใบให้มีขนาด 1 x 1 เซนติเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวภายให้สภาพปลอดเชื้อเช่นเดียวกับฝัก แต่ใช้สารละลาย Ca (OCl_2) ที่มีความเข้มข้น 10% แทน

ตัดส่วนปลายทั้ง 2 ข้างของฝักออก และตัดขอบทั้ง 4 ด้านของใบออกให้เหลือขนาด 5 x 5 มิลลิเมตร เลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสังเคราะห์ชนิดต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ (ตารางที่ 4) เก็บรักษาเนื้อเยื่อภายให้สภาพเดียวกับข้อ 1.1

1.3 การชักนำให้เกิดต้นอ่อนจากเอมบริโอ (embryo axis)

นำเมล็ดโกงกางใบเล็กมาล้างทำความสะอาดผิวภายนอกก่อน แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ผิวภายให้สภาพปลอดเชื้อ โดยแช่ในสารละลาย Ca (OCl_2) 20% ผสม Tween 20 2-3 หยด เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที

ใช้มีดผ่าตัดที่ฆ่าเชื้อแล้วลอกเปลือกหุ้มเมล็ดออก จากนั้นลอกส่วนใบเลี้ยงออกอีกชั้นหนึ่ง เลี้ยง embryo axis บนอาหารสังเคราะห์ชนิดต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ (ตารางที่ 4) เก็บรักษาเนื้อเยื่อภายให้สภาพเดียวกับข้อ 1.1

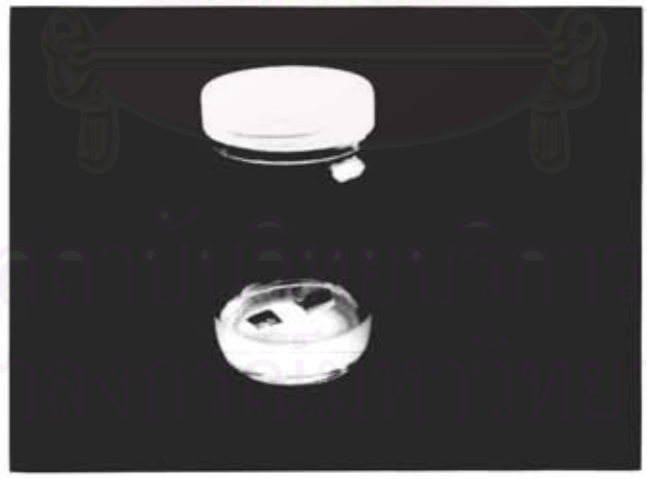
2. การเตรียมอาหารสังเคราะห์

อาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อมี 2 สภาพคือ สภาพอาหารกึ่งแข็ง และสภาพอาหารเหลว

2.1 การเตรียมอาหารวุ้นชนิดต่าง ๆ

เตรียมอาหารวุ้นสูตร MS ที่ผสมฮอร์โมน Indoleacetic acid (IAA) Indolebutyric acid (IBA), α-Naphthaleneacetic acid (NAA), 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 6-Benzylamino purine (BAP), 6-Furfurylamino purine (kinetin) และ Gibberellic acid (GA_3) ในระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน (ตารางที่ 4) ปรับความเป็นกรดด่าง (pH) ให้เท่ากับ 5.7 โดยใช้ HCl ความเข้มข้น 1 N เมื่อค่า pH สูงเกินไป หรือใช้ KOH ความเข้มข้น 1 N

ภาพที่ 6 : การเพาะเลี้ยงยอดโกงกางใบเล็ก ในอาหารกึ่งแข็ง MS



ภาพที่ 7 : การชักนำให้เกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อส่วนใบโกงกางใบเล็ก ในอาหารกึ่งแข็ง MS

เมื่อค่า pH มีค่าต่ำเกินไป บรรจุอาหารลงในขวด ๆ ละ 20 มิลลิลิตร แล้วปิดฝา ฆ่าเชื้ออาหารด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ใช้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำอาหารไปเก็บที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

2.2 การเตรียมอาหารเหลวชนิดต่าง ๆ

เตรียมอาหารเหลวตามสูตร MS ที่ผสมฮอร์โมนระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน (ตารางที่ 4) ปรับ pH ให้เท่ากับ 5.7 แบ่งอาหารที่เตรียมดังกล่าวเทใส่หลอดทดลองขนาด 25 x 180 มิลลิเมตร หลอดละ 10 มิลลิลิตร นำกระดาษกรองมาพับครึ่ง และพับอีกครั้งหนึ่ง แล้วจึงนำมาหักพับเป็นรูปตัว M สำหรับวางเนื้อเยื่อพืช ซึ่งกระดาษกรองนี้ทำหน้าที่ดูดอาหารเหลวขึ้นมาเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ปิดหุ้มหลอดทดลองแต่ละหลอดด้วยกระดาษอลูมินัมที่ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 7 x 7 เซนติเมตร แล้วรัดด้วยยางรัดของ นึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บอาหารสังเคราะห์ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ห้องสมุดกลาง ... จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 8 : การเลี้ยงเนื้อเยื่อโกงกางใบเล็กด้วยอาหารเหลวในหลอดทดลอง โดยใช้กระดาษกรองพับเป็นรูปตัว M สำหรับวางเนื้อเยื่อพืช

ภาพที่ 9 : การเลี้ยงเนื้อเยื่อโกงกางใบเล็กด้วยอาหารเหลวในขวดรูปชมพู่ โดยวางขวดบนเครื่องเขย่า (shaker)

สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 4 : แสดงระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน IAA, IBA, NAA, 2,4-D, BAP และ kinetin ในอาหารสังเคราะห์ Murashige & Skoog (1962) สูตร T_1 - T_{128}

auxins \ cytokinins		BAP (มก./ล.)				kinetin (มก./ล.)			
		0	2	5	10	0	2	5	10
IAA (มก./ล.)	0	T_1	T_2	T_3	T_4	T_5	T_6	T_7	T_8
	2	T_9	T_{10}	T_{11}	T_{12}	T_{13}	T_{14}	T_{15}	T_{16}
	5	T_{17}	T_{18}	T_{19}	T_{20}	T_{21}	T_{22}	T_{23}	T_{24}
	10	T_{25}	T_{26}	T_{27}	T_{28}	T_{29}	T_{30}	T_{31}	T_{32}
IBA (มก./ล.)	0	T_{33}	T_{34}	T_{35}	T_{36}	T_{37}	T_{38}	T_{39}	T_{40}
	2	T_{41}	T_{42}	T_{43}	T_{44}	T_{45}	T_{46}	T_{47}	T_{48}
	5	T_{49}	T_{50}	T_{51}	T_{52}	T_{53}	T_{54}	T_{55}	T_{56}
	10	T_{57}	T_{58}	T_{59}	T_{60}	T_{61}	T_{62}	T_{63}	T_{64}
NAA (มก./ล.)	0	T_{65}	T_{66}	T_{67}	T_{68}	T_{69}	T_{70}	T_{71}	T_{72}
	2	T_{73}	T_{74}	T_{75}	T_{76}	T_{77}	T_{78}	T_{79}	T_{80}
	5	T_{81}	T_{82}	T_{83}	T_{84}	T_{85}	T_{86}	T_{87}	T_{88}
	10	T_{89}	T_{90}	T_{91}	T_{92}	T_{93}	T_{94}	T_{95}	T_{96}
2,4-D (มก./ล.)	0	T_{97}	T_{98}	T_{99}	T_{100}	T_{101}	T_{102}	T_{103}	T_{104}
	2	T_{105}	T_{106}	T_{107}	T_{108}	T_{109}	T_{110}	T_{111}	T_{112}
	5	T_{113}	T_{114}	T_{115}	T_{116}	T_{117}	T_{118}	T_{119}	T_{120}
	10	T_{121}	T_{122}	T_{123}	T_{124}	T_{125}	T_{126}	T_{127}	T_{128}

หมายเหตุ

T_n = สูตรอาหารที่ n โดยที่ n = 1, 2, 3,..., 128

สูตรที่ 129 : 1/2 MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตใดๆ

สูตรที่ 130 : MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 10 %

สูตรที่ 131 : MS ที่เติม NaCl 0.1 มก./ล.

สูตรที่ 132 : Hildebrandt, Riker & Dauggar (1946)

สูตรที่ 133 : Nitsch & Nitsch (1956)

สูตรที่ 134 : White (1963)

สูตรที่ 135 : Gautheret (1942)

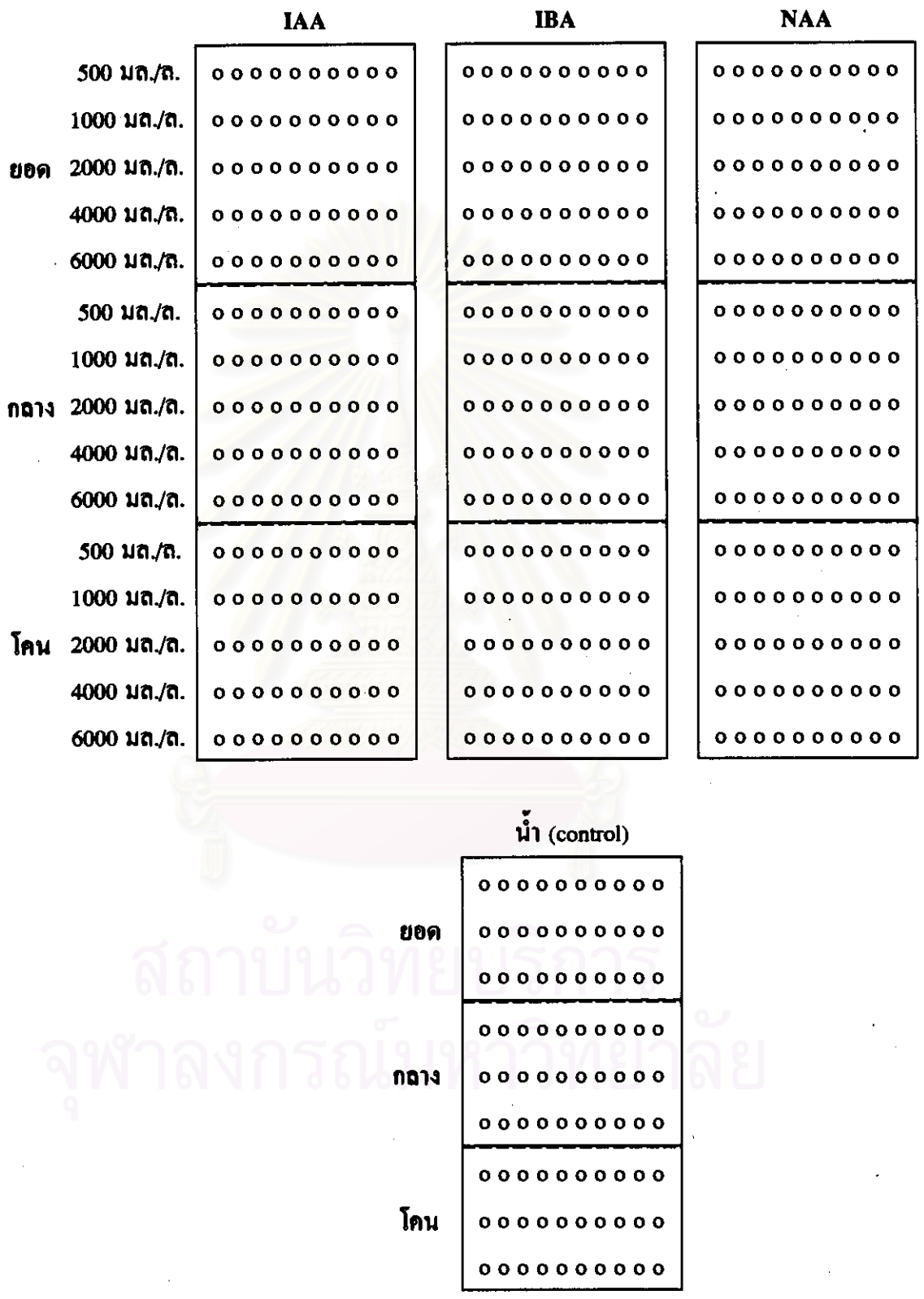
สูตรที่ 136 : Heller (1953)

การปักชำกล้าไม้โกงกางใบเล็กในกระบะทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ใช้ฝักโกงกางใบเล็กซึ่งเก็บตัวอย่างสดมาจากจังหวัดชุมพรและนราธิวาส โดยคัดเลือกฝักที่สมบูรณ์ ไม่มีแมลงเจาะทำลาย ขนาดของฝักใกล้เคียงกันคือยาวประมาณ 30 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 30 $\pm$ 3 กรัม นำฝักโกงกางใบเล็กที่คัดเลือกแล้วมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำ ตัดเป็นท่อน ๆ ละประมาณ 10 เซนติเมตร ซึ่งจะได้ 3 ท่อนต่อ 1 ฝักคือ ท่อนยอด ท่อนกลางและท่อนโคน นำส่วนโคนของแต่ละท่อนจุ่มลงในสารเร่งการเจริญเติบโตชนิดต่าง ๆ คือ IAA, IBA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 500, 1,000, 2,000, 4,000 และ 6,000 มก./ล. ในแต่ละการทดลองทำ 10 ซ้ำ โดยใช้วิธีจุ่มแบบ overnight เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำฝักแต่ละท่อนไปปักชำในกระบะทรายที่จัดเตรียมไว้ โดยใช้ทรายผสมปุ๋ยหมักด้วยอัตราส่วน 2 : 1 ใช้ไม้ไผ่ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับท่อนชำ ปักนำเพื่อให้เกิดหลุมลึกประมาณ 5 เซนติเมตร ระยะระหว่างหลุม 3 x 3 เซนติเมตร ปักชำกระบะละ 15 แถว ๆ ละ 10 หลุม ซึ่งแบ่งเป็นท่อนยอด, ท่อนกลาง และท่อนโคนอย่างละ 5 แถว ตามลำดับ โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in Complete Randomized Design (ภาพที่ 10) วางกระบะทรายไว้กลางแจ้ง พรางแสงด้วยซาแรน 70 % รดด้วยน้ำจืดวันละ 2 ครั้ง ในช่วงเช้าและเย็น ขังน้ำไว้ในกระบะให้มีความสูงเท่ากับระดับทรายที่อยู่ในกระบะ และทำการระบายน้ำออกทุกสัปดาห์ โดยคาดหมายว่ากล้าไม้แต่ละส่วนที่ได้รับสารเร่งการเจริญเติบโตจะมีอัตราการรอดตาย และมีอัตราการเจริญเติบโตที่ดี

หลังจากปลูก 2 สัปดาห์ ตรวจพัฒนาการของราก โดยบันทึกจำนวนรากและวัดความยาวรากในแต่ละท่อนทุก ๆ 2 สัปดาห์ นาน 12 สัปดาห์ หาค่าเฉลี่ยจำนวนรากและความยาวรากต่อท่อน เพื่อเปรียบเทียบว่าสารเร่งการเจริญเติบโตชนิดใด และที่ระดับความเข้มข้นเท่าไหร่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้ฝักโกงกางใบเล็กออกรากได้ดีที่สุด บันทึกจำนวนยอดของท่อนยอด และจำนวนตาของท่อนกลาง, ท่อนโคน รวมทั้งวัดความสูงของยอดทุก ๆ เดือน นาน 6 เดือน เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของฝักโกงกางใบเล็กแต่ละท่อน โดยการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม Statistix (SX) Version 4.0

ภาพที่ 10 : แผนผังการทดลองการปักชำกล้าไม้โกงกางใบเล็กที่แบ่งออกเป็น 3 ส่วน



สถานที่ เรือนเพาะชำ ภาควิชาโรคพืช คณเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เวลา ครั้งที่ 1 : ปักชำ 10 พ.ย. 37 - 10 พ.ค. 58 ครั้งที่ 2 : ปักชำ 15 มิ.ย. 38 - 15 ธ.ค. 38