

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

การฟอกฆ่าเชื้อส่วนต่างๆของอาร์ติโชค

เนื่องจากอาร์ติโชคเป็นพืชที่มีลำต้นอยู่ชิดกับดินและมีใบจำนวนมากจึงง่ายต่อการปนเปื้อนของเชื้อ นอกจากนี้เมล็ดที่ได้จะมีเปลือกหนาและแข็งทำให้ยากต่อฆ่าเชื้อที่ติดมาภายในเมล็ด ดังนั้นจึงควรหาวิธีการที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดเพื่อใช้ในการทดลอง ซึ่งได้แบ่งเป็นการทดลองต่าง ๆ กันคือ

การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดอาร์ติโชคสายพันธุ์ HV 271

วิธีที่ 1 ล้างเมล็ดให้สะอาด แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย CaOCl 10 % ที่ผสม Tween 20 2 หยด เขย่านาน 40 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง แต่ละครั้งใช้เวลา 5 นาที วางเมล็ดบนอาหารเพาะเลี้ยง 2 ชนิดคือ water agar และ MS + BAP 0.5 mg/l + sucrose 30.0 g/l pH 5.7 โดยอาหารแต่ละชนิดใช้เมล็ดในการทดลอง 25 เมล็ด

วิธีที่ 2 ล้างเมล็ดให้สะอาด แช่เมล็ดในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เมล็ดฟองตัว ชับน้ำให้แห้ง แล้วจุ่มใน ethanol 70 % นาน 5 วินาที จากนั้นแช่ในสารละลาย CaOCl 10 % ที่ผสม Tween 20 2 หยด นำเข้า suction pump เขย่าเป็นเวลา 40 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที วางเมล็ดบนจานแก้วที่มีสารละลายฆ่าเชื้อที่เติม citric acid 150.0 mg/l และ ascorbic acid 100.0 mg/l คัดเมล็ดออกเป็น 2 ส่วน เพื่อแช่เอาเปลือกเมล็ดออก นำส่วนที่ติดกับเอมบริโอมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS + IAA 0.4 mg/l + BAP 12.0 mg/l + sucrose 40.0 g/l + agar 7 g/l pH 5.6 ทดลอง 20 เมล็ด

นำขวดเพาะเลี้ยงเมล็ดที่ได้จากการฟอกฆ่าเชื้อทั้ง 2 วิธี ไปเก็บที่ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ในสภาพได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 26°C บันทึกจำนวนเมล็ดที่ไม่เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ พร้อมทั้งสังเกตการพัฒนาของเนื้อเยื่อทุก 1 สัปดาห์จนครบ 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการฟอกฆ่าเชื้อ และผลของอาหารที่มีต่อการเจริญของต้นอ่อน

การฟอกฆ่าเชื้อหน่ออาร์ติโชค สายพันธุ์ *Grosso Romanesco*

คัดเลือกหน่อจากต้นที่เจริญเติบโตได้ดีและให้ผลผลิตสูงโดยแยกหน่อในฤดูฝน นำมาตัดใบส่วนบนออกแล้วล้างให้สะอาด จากนั้นทำการฟอกฆ่าเชื้อ 3 วิธี ได้แก่

วิธีที่ 1 แช่ในสารละลาย CaOCl_2 10 % นำเข้า suction pump แล้วเขย่านาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

วิธีที่ 2 แช่ในสารละลายที่เติม HgCl_2 2.0 g/l วางไว้ใน suction pump จากนั้นเขย่าเป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

วิธีที่ 3 แช่ในสารละลาย CaOCl_2 10 % 5 นาที จากนั้นแช่ในสารละลายที่เติม HgCl_2 2 g/l วางไว้ใน suction pump เขย่านาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

ตัดยอดที่ฟอกได้จากทั้ง 3 วิธี ในสารละลายฆ่าเชื้อที่เติม citric acid 150.0 mg/l และ ascorbic acid 100.0 mg/l วางบนอาหาร MS + IAA 0.5 mg/l + kinetin 0.05 mg/l + inositol 0.1 g/l + sucrose 20.0 g/l + agar 7.0 g/l pH 5.6 แต่ละวิธี ทำการทดลอง 10 ซ้ำ นำขวดเพาะเลี้ยงไปเก็บที่ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ในสภาพได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 26°C บันทึกจำนวนยอดที่ไม่เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ สังเกตการเจริญของยอดทุก 1 สัปดาห์ จนครบ 4 สัปดาห์ แล้วเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการฟอกฆ่าเชื้อ

การทดสอบสูตรอาหารเพื่อชักนำให้อาร์ติโชคเกิดการแตกกอ

อาร์ติโชคสามารถขยายพันธุ์แบบปักชำด้วยการแยกหน่อ ซึ่งเป็นวิธีที่ขยายพันธุ์ได้ช้าและมีอัตราการรอดตายต่ำ เนื่องจากเกิดโรคโคนเน่า จึงจำเป็นต้องใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาช่วยในการเพิ่มจำนวนต้น เนื่องจากสามารถขยายพันธุ์อย่างรวดเร็วและได้ต้นพันธุ์ที่ปลอดโรค ดังนั้นการทดลองส่วนนี้ต้องการคัดเลือกสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้อาร์ติโชคแต่ละสายพันธุ์เกิดการแตกกอได้ดีที่สุด อีกทั้งแสดงให้เห็นผลของฮอร์โมนที่มีต่อชักนำเนื้อเยื่อให้เจริญเป็นยอดใหม่ และจำนวนต้นอ่อนที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฮอร์โมนแตกต่างกัน

ทำการทดสอบสูตรอาหารกับอาร์ติโชคที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ HV 271 สายพันธุ์จากฝรั่งเศส สายพันธุ์ Green Globe Improved สายพันธุ์ Nun 6372 สายพันธุ์ Nun 6374 และ สายพันธุ์ *Grosso Romanesco* ด้วยการนำต้นที่แข็งแรงและมีความสูงประมาณ 2 cm. มาตัดใบแก่และส่วนที่เป็นสีน้ำตาลออก จากนั้นเลี้ยงยอดอาร์ติโชคในขวดทดลองซึ่งบรรจุอาหารที่ดัดแปลงมาจาก MS (1962) ด้วยการเติมฮอร์โมน NAA, IAA, BAP, kinetin, 2ip, Thidiazuron และ sucrose ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยใช้อาหาร 1 ขวดต่ออาร์ติโชค 1 ยอด

สูตรอาหารที่ใช้ชักนำให้อาร์ติโชคแต่ละสายพันธุ์เกิดการแตกกอแสดงในตารางที่ 1 - 4

ตารางที่ 1 แสดงสูตรอาหารที่ใช้ชักนำให้อาร์ติโชคสายพันธุ์ HV 271 เกิดการแตกกอ

สูตรที่	MS	NAA (mg/l)	IAA (mg/l)	BAP (mg/l)	Kinetin (mg/l)	Inositol (g/l)	Sucrose (g/l)
1	H	-	0.5	-	0.05	0.1	20.0
2	N	-	0.5	-	0.05	0.1	20.0
3	H	0.5	-	-	0.05	0.1	20.0
4	H	-	-	-	0.5	0.1	20.0
5	H	-	-	-	1.0	0.1	20.0
6	H	-	-	-	2.0	0.1	20.0
7	H	-	-	-	3.0	0.1	20.0
8	H	-	-	-	4.0	0.1	20.0
9	H	0.1	-	-	1.0	0.1	20.0
10	H	0.1	-	-	2.5	0.1	20.0
11	H	0.2	-	-	2.5	0.1	20.0
12	H	0.5	-	-	2.5	0.1	20.0
13	H	0.5	-	-	2.0	0.1	20.0
14	H	-	0.5	-	2.0	0.1	20.0
15	N	-	0.5	-	6.0	0.1	30.0
16	N	-	-	0.5	-	0.1	30.0
17	H	-	-	1.0	-	0.1	20.0
18	H	-	-	2.0	-	0.1	20.0
19	N	-	-	2.5	-	0.1	30.0
20	H	-	-	3.0	-	0.1	20.0
21	H	-	-	4.0	-	0.1	20.0
22	H	-	-	5.0	-	0.1	30.0
23	H	-	-	10.0	-	0.1	20.0
24	H	0.5	-	0.5	-	0.1	20.0
25	H	0.5	-	1.0	-	0.1	20.0

ตารางที่ 1 (ต่อ) แสดงสูตรอาหารที่ใช้ชักนำให้อาร์ติโชกสายพันธุ์ HV 271 เกิดการแตกกอ

สูตรที่	MS	NAA (mg/l)	IAA (mg/l)	BAP (mg/l)	Kinetin (mg/l)	Inositol (g/l)	Sucrose (g/l)
26	H	0.5	-	2.5	-	0.1	20.0
27	H	0.1	-	5.0	-	0.1	30.0
28	H	-	0.1	3.0	-	0.1	20.0
29	H	-	0.5	10.0	-	0.1	20.0
30	H	-	0.5	2.0	-	0.1	20.0
31	H	-	0.5	5.0	-	0.1	20.0
32	H	-	0.1	12.0	-	0.1	20.0
33	H	-	0.2	12.0	-	0.1	20.0
34	H	-	0.5	10.0	-	0.1	20.0

ตารางที่ 2 แสดงสูตรอาหารที่ใช้ชักนำให้อาร์ติโชกสายพันธุ์จากฝรั่งเศสเกิดการแตกกอ

สูตรที่	MS	NAA (mg/l)	IAA (mg/l)	BAP (mg/l)	Kinetin (mg/l)	2iP (mg/l)	TDZ (mg/l)	Sucrose (g/l)
1	H	-	-	0.5	-	-	-	20.0
2	H	-	-	1.0	-	-	-	30.0
3	H	-	-	2.0	-	-	-	20.0
4	H	-	-	3.0	-	-	-	20.0
5	H	-	-	4.0	-	-	-	20.0
6	H	-	-	5.0	-	-	-	20.0
7	H	-	-	-	0.5	-	-	20.0
8	H	-	-	-	1.0	-	-	20.0
9	H	-	-	-	2.0	-	-	20.0
10	H	-	-	-	3.0	-	-	20.0
11	H	-	-	-	4.0	-	-	20.0

ตารางที่ 2 (ต่อ) แสดงสูตรอาหารที่ใช้ชักนำให้อาร์ติโชกสายพันธุ์จากฝรั่งเศสเกิดการแตกกอ

สูตรที่	MS	NAA (mg/l)	IAA (mg/l)	BAP (mg/l)	Kinetin (mg/l)	2iP (mg/l)	TDZ (mg/l)	Sucrose (g/l)
12	N	-	-	-	5.0	-	-	20.0
13	N	-	-	-	7.0	-	-	20.0
14	N	-	-	0.5	-	-	-	30.0
15	N	-	0.5	0.5	-	-	-	30.0
16	N	-	-	5.0	-	-	-	30.0
17	N	0.1	-	5.0	-	-	-	30.0
18	N	-	0.5	2.0	-	-	-	30.0
19	N	-	0.5	5.0	-	-	-	30.0
20	N	-	-	2.5	-	-	-	30.0
21	H	-	-	-	-	-	1.0	30.0
22	H	-	-	-	-	-	3.0	30.0
23	H	0.1	-	-	1.0	-	-	30.0
24	H	0.1	-	-	2.5	-	-	30.0
25	H	0.5	-	-	2.5	-	-	30.0
26	H	-	1.0	-	6.0	-	-	30.0
27	H	-	-	-	-	1.0	-	30.0
28	H	-	-	-	-	3.0	-	30.0
29	H	-	-	-	2.0	10.0	-	30.0

ตารางที่ 3 แสดงสูตรอาหารที่ใช้ชักนำให้อาร์ติโชคสายพันธุ์ Green Globe Improved

Nun 6372 และ Nun 6374 เกิดการแตกกอ

สูตรที่	MS	NAA (mg/l)	IAA (mg/l)	BAP (mg/l)	Kinetin (mg/l)	2iP (mg/l)	TDZ (mg/l)	Sucrose (g/l)
1	H	-	0.5	-	0.05	-	-	20.0
2	N	-	-	0.5	-	-	-	30.0
3	N	-	0.5	0.5	-	-	-	30.0
4	N	-	-	2.5	-	-	-	30.0
5	H	0.1	-	-	1.0	-	-	20.0
6	H	0.1	-	-	2.5	-	-	20.0
7	H	0.5	-	-	2.5	-	-	20.0
8	H	-	-	-	2.0	-	-	20.0
9	H	-	-	-	3.0	-	-	20.0
10	H	-	-	-	4.0	-	-	20.0
11	H	-	-	-	5.0	-	-	20.0
12	H	-	-	-	7.0	-	-	20.0
13	H	-	-	-	-	-	1.0	30.0
14	H	-	-	-	-	-	3.0	30.0

ตารางที่ 4 แสดงสูตรอาหารที่ใช้ชักนำให้อาร์ติโชคสายพันธุ์ Grosso Romanesco เกิดการแตกกอ

สูตรที่	MS	NAA (mg/l)	IAA (mg/l)	BAP (mg/l)	Kinetin (mg/l)	Sucrose (mg/l)
1	H	0.1	-	-	1.0	20.0
2	H	0.1	-	-	2.5	20.0
3	H	0.5	-	-	2.5	20.0
4	N	-	-	0.5	-	30.0
5	N	-	0.5	0.5	-	30.0

อาหารเพาะเลี้ยงทุกสูตรมี inositol 0.1 g/l และ agar 7 g/l pH 5.6 แต่ละสูตรอาหารใช้ยอดอาร์ติโชคสายพันธุ์ HV 271 และ สายพันธุ์จากฝรั่งเศส สายพันธุ์ละ 30 ช้ำ และยอดอาร์ติโชคสายพันธุ์ Green Globe Improved, Nun 6372, Nun 6374 และ Grosso Romanesco สายพันธุ์ละ 5 ช้ำ

เก็บขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยจัดให้ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 26 ° C สังเกตลักษณะของยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงทุก 1 สัปดาห์ บันทึกจำนวนและความสูงของยอดที่เกิดขึ้นบนอาหารแต่ละชนิดหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อเปรียบเทียบผลของอาหารต่อการแตกกอของอาร์ติโชค

การทดสอบสูตรอาหารเพื่อชักนำให้อาร์ติโชคเกิดการออกราก

หลังจากที่ต้นอาร์ติโชคทั้ง 6 สายพันธุ์ แรกกอบบนอาหารเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ นำยอดที่ได้มาเลี้ยงบนอาหาร Half – macro MS + IAA 0.5 mg/l + kinetin 0.05 mg/l + inositol 0.1 g/l + sucrose 20.0 g/l + agar 7.0 g/l pH 5.6 เพื่อทำให้ต้นแข็งแรงและเกิดการยึดตัว ตัดเลือกต้นที่มีความสูงประมาณ 3 cm. มาเลี้ยงในหลอดทดลองที่บรรจุ อาหาร Half – macro MS ที่มีความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA, IAA, IBA และ GA₃ แตกต่างกัน เพื่อกระตุ้นการพัฒนาของระบบราก โดยแสดงองค์ประกอบของอาหารที่ใช้ชักนำให้อาร์ติโชคแต่ละสายพันธุ์ให้เกิดรากในตารางที่ 5 - 7

ตารางที่ 5 แสดงสูตรอาหารที่ใช้ชักนำให้อาร์ติโชคสายพันธุ์ HV 271 สร้างราก

สูตรที่	MS	NAA (mg/l)	IBA (mg/l)	GA ₃ (mg/l)	Activated chacoal (g/l)	Sucrose (g/l)
1	H	-	-	-	-	20.0
2	H	0.5	-	-	-	20.0
3	H	0.5	-	1.0	-	20.0
4	H	0.5	-	2.0	-	20.0
5	H	0.5	-	5.0	-	20.0
6	H	1.0	-	1.0	-	20.0
7	H	2.0	-	1.0	-	20.0
8	H	3.0	-	1.0	-	20.0

ตารางที่ 5 (ต่อ) แสดงสูตรอาหารที่ใช้ชักนำให้อาร์ติโชกสายพันธุ์ HV 271 สร้างราก

สูตรที่	MS	NAA (mg/l)	IBA (mg/l)	GA ₃ (mg/l)	Activated chacoal (g/l)	Sucrose (g/l)
9	H	5.0	-	1.0	-	20.0
10	H	-	0.1	-	-	20.0
11	H	-	0.5	-	-	20.0
12	H	-	1.0	-	-	20.0
13	H	-	1.0	-	1.0	20.0

ตารางที่ 6 แสดงสูตรอาหารที่ใช้ชักนำให้อาร์ติโชกสายพันธุ์จากฝรั่งเศสสร้างราก

สูตรที่	MS	NAA (mg/l)	IAA (mg/l)	GA ₃ (mg/l)	Sucrose (g/l)
1	H	0.1	-	-	20.0
2	H	0.5	-	-	20.0
3	H	1.0	-	-	20.0
4	H	2.0	-	-	20.0
5	H	3.0	-	-	20.0
6	H	-	0.5	-	20.0
7	H	-	1.0	-	20.0
8	H	-	2.0	-	20.0
9	H	-	3.0	-	20.0
10	H	-	4.0	-	20.0
11	H	-	5.0	-	20.0
12	H	0.5	-	1.0	20.0
13	H	0.5	-	2.0	20.0

ตารางที่ 7 แสดงสูตรอาหารที่ใช้ชักนำให้อาร์ติโชคสายพันธุ์ Green Globe Improved, Nun 6372, Nun 6374 และ Grosso Romanesco สร้างราก

สูตรที่	MS	NAA (mg/l)	IAA (mg/l)	GA ₃ (mg/l)	Sucrose (g/l)
1	H	0.1	-	-	20.0
2	H	0.5	-	-	20.0
3	H	0.5	-	1.0	20.0
4	H	0.5	-	2.0	20.0
5	H	2.0	-	-	20.0
6	H	-	1.0	-	20.0

อาหารแต่ละสูตร จะใช้ต้นอ่อนสายพันธุ์ HV 271 และ สายพันธุ์จากฝรั่งเศส ทำการทดลอง 30 ซ้ำ สายพันธุ์ Green Globe Improved, Nun 6372, Nun 6374 และ Grosso Romanesco ทำการทดลอง 5 ซ้ำ เก็บหลอดเพาะเลี้ยงไว้ในสภาพที่ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 26 ° C บันทึกจำนวนต้นที่ออกรากทุก 1 สัปดาห์จนครบ 4 สัปดาห์ พร้อมทั้ง สังเกตลักษณะรากที่เกิดขึ้นในอาหารแต่ละชนิด

การย้ายปลูกอาร์ติโชค

หลังจากการขยายพันธุ์และกระตุ้นให้เกิดรากด้วยอาหารสูตรต่างๆ จะได้ต้นอาร์ติโชคที่แข็งแรงและมีระบบรากที่สมบูรณ์ นำต้นที่ได้จากห้องปฏิบัติการออกปลูกโดยล้างวันที่ติดอยู่กับรากออกให้หมดด้วยน้ำสะอาด แล้วปลูกในถาดเพาะเมล็ดขนาด 55 หลุมที่บรรจุขี้เถ้ากลบทรายหยาบ และดินร่วน ในอัตราส่วน 1 : 1 : 1 เป็นวัสดุปลูก รดน้ำให้ชุ่ม เก็บไว้ในตู้ควบคุมที่มีสภาพอุณหภูมิ 25 ° C ความชื้น 85 % เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จึงนำออกมาวางไว้ในโรงเรือน บันทึกลักษณะต้นที่ได้และจำนวนต้นที่รอดชีวิต โดยทำการทดลองสายพันธุ์ละ 50 ซ้ำ