บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและสภาพแวดล้อมต่อการขยายพันธุ์และการสร้างเหง้าของขิงในสภาพปลอดเชื้อ ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ 1) การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการขยายพันธุ์ขิง 2) การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดแคลลัสในขิง และ 3) การศึกษาการชักนำให้เกิดการสร้างเหง้าขิงในสภาพปลอดเชื้อ มีอุปกรณ์และวิธีการทดลองดังต่อไปนี้

3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 วัสดุอุปกรณ์ในการเตรียมสารเคมีและอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1) เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบหยาบ Denver Instrument รุ่น TB-4002
2) เครื่องชั่งแบบละเอียด Denver Instrument รุ่น TB-224
3) เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter) รุ่น PHS-3CW
4) หม้อนึ่งความดัน
5) หลอดทดลองขนาด 25×150 มิลลิเมตร
6) ขวดวัดปริมาตร
7) กระบอกวัดปริมาตร
8) ขวดใส่สารละลายเข้มข้น
9) ช้อนตักสาร
10) แท่งแก้วคนสารเคมี
11) กรวยแก้ว
12) หลอดหยด
13) ปิเปต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.2 วัสดุอุปกรณ์ในสภาพปลอดเชื้อ (ในตู้กรองอากาศ)

1) ด้ามมีดผ่าตัด เบอร์ 3
2) ใบมีดผ่าตัด เบอร์ 10 และ 11
3) ปากคีบสั้นและยาว
4) ตะเกียงแอลกอฮอล์
5) พลาสติกสำหรับรองตัด
6) จานเพาะเชื้อ
7) หลอดทดลองสำหรับใส่แอลกอฮอล์

3.1.3 วัสดุอุปกรณ์อื่น ๆ

1) หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์สีขาว ความเข้มแสง 2,580 และ 3,000 ลักซ์
2) หลอดไฟ LED สีขาว ความเข้มแสง 3,010 ลักซ์
3) หลอดไฟ LED สีแดง ความเข้มแสง 350 ลักซ์
4) หลอดไฟ LED สีแดง+สีน้ำเงิน ความเข้มแสง 420 ลักซ์
5) เครื่องวัดความเข้มแสง (Lux meter) รุ่น LX 1010BS

หมายเหตุ: ความเข้มแสงคำนวณจากการวัดความเข้มแสงบริเวณใต้หลอดไฟ 9 ตำแหน่ง โดยมีระยะห่างระหว่างหลอดไฟและเครื่องวัดความเข้มแสง 40 เซนติเมตร

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 สารที่ใช้สำหรับเตรียมอาหารสังเคราะห์

1) สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS)

1.1) $CaCl_2.2H_2O$ (Merck)
1.2) $MgSO_4.7H_2O$ (Fluka)
1.3) KH_2PO_4 (Fluka)
1.4) KNO_3 (Univar)
1.5) NH_4NO_3 (Q Rëc)
1.6) $MnSO_4.4H_2O$ (Merck)
1.7) $ZnSO_4.7H_2O$ (Codex Caroerba)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.8) H_3BO_3 (Merck)

1.9) KI (Riedel-De Haën Ag Seelze-Hannover)

1.10) $Na_2MoO_4.2H_2O$ (Merck)

1.11) $CoCl_2.6H_2O$ (Univar)

1.12) $CuSO_4.5H_2O$ (Merck)

1.13) $FeSO_4.7H_2O$ (Univar)

1.14) Na_2.EDTA (Merck)

1.15) Myo-inositol (Fluka)

1.16) Glycine (Fluka)

1.17) Thiamine.HCL (Sigma)

1.18) Pyridoxin.HCL (Sigma)

1.19) Nicotinic acid (Fluka)

2) ผงวุ้น (เฮลลิคอปเตอร์)

3) น้ำตาลซูโครส (มิตรผล)

3.2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1) 6-Benzyladenine (BA) (Fluka)

2) 1-Phenyl-3-(1,2,3-thdiazol-5-yl)urea, thidiazuron (TDZ) (Riedel-de Haën)

3) 6-Furfuryladenine, kinetin (Kn) (Sigma)

4) 2, 4-Dichloro-phenoxyacetic Acid (2,4-D) (Sigma)

5) 2-Methoxy-3,6-dichlorobenzoic Acid (Dicamba) (Sigma)

6) ผงถ่านกัมมันต์ (activated carbon, AC) (ซีเอ็ม เคมีคอล แอนด์ แล็บซัพพลายส์)

3.2.4 สารที่ใช้สำหรับทำความสะอาดและฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ น้ำยาล้างจาน, 70% ethyl alcohol, Tween 80 และสารละลาย Clorox® (active ingredient: 6% NaOCl)

3.3 วิธีการทดลอง

การเตรียมต้นขิงเพื่อใช้ในการทดลอง นำเหง้าขิงพันธุ์ขิงใหญ่ที่มีอายุ 8-9 เดือนหลังจากปลูกเก็บรักษาในอุณหภูมิห้องจนตาขิงเริ่มงอกหรือมีสีเขียวนูนขึ้น แล้วนำมาตัดส่วนตาที่กำลังงอก นำไปล้างน้ำให้สะอาด ฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 1 นาที แล้วนำไปฟอกด้วยสารละลาย Clorox® เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ที่มี Tween 80 จำนวน 2-3 หยดต่อสารละลาย Clorox®

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่านาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร อีก 3 ครั้ง ในสภาพปลอดเชื้อ จากนั้นตัดเนื้อเยื่อบริเวณตาขิงขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร และแกะใบเกล็ดออก นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ดัดแปลง ที่เติม BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขวดแก้วที่มีอาหารเพาะเลี้ยง 50 มิลลิลิตร เปลี่ยนถ่ายอาหารและตัดย้ายเพิ่มปริมาณต้นให้ได้ต้นขิงเพื่อใช้ในการทดลอง

3.3.1 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการขยายพันธุ์ขิง

1) ผลของ BA และ TDZ ต่อการขยายพันธุ์ขิง

วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล 3 × 4 ในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial 3 × 4 in Completely Randomized Design) โดยมีปัจจัยหลัก 2 ปัจจัย ปัจจัยที่ 1 คือ ระดับความเข้มข้นของ BA จำนวน 3 ระดับ ได้แก่ 0, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และปัจจัยที่ 2 คือ ระดับความเข้มข้นของ TDZ จำนวน 4 ระดับ ได้แก่ 0, 0.25, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งหมด 12 กรรมวิธี ดังในตารางที่ 3.1 แต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ชิ้นส่วน โดยนำต้นขิงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีความสูง 10 เซนติเมตร คัดเลือกต้นที่มีขนาดลำต้นเทียมเท่า ๆ กันมาตัดใบและรากออก ให้ต้นมีความสูงประมาณ 1.5 เซนติเมตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง 10 มิลลิลิตร ที่มี BA และ/หรือ TDZ ตามกรรมวิธีทดลอง เพาะเลี้ยงต้นในห้องควบคุมที่ได้รับแสง 24 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ และมีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

บันทึกการเจริญเติบโตของต้นทุกสัปดาห์ ได้แก่ จำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นส่วน ความสูงต้น จำนวนราก และความยาวราก วิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยหลักและปฏิสัมพันธ์ของปัจจัยทั้งสองโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3.1 กรรมวิธีการทดลองผลของ BA และ TDZ ต่อการขยายพันธุ์ขิง

BA	TDZ (มก./ล.)			
(มก./ล.)	0.00	0.25	0.50	1.00
0.0	กรรมวิธีที่ 1	กรรมวิธีที่ 2	กรรมวิธีที่ 3	กรรมวิธีที่ 4
0.5	กรรมวิธีที่ 5	กรรมวิธีที่ 6	กรรมวิธีที่ 7	กรรมวิธีที่ 8
1.0	กรรมวิธีที่ 9	กรรมวิธีที่ 10	กรรมวิธีที่ 11	กรรมวิธีที่ 12

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2) ผลของ BA, TDZ และ kinetin ต่อการขยายพันธุ์ขิง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) มีกรรมวิธีทั้งหมด 11 กรรมวิธี ได้แก่ 1) ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (กรรมวิธีควบคุม) 2) BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร 3) BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + Kn 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 4) BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + Kn 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 5) BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + Kn 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 6) TDZ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร + Kn 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 7) TDZ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร + Kn 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 8) TDZ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร + Kn 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 9) BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร + Kn 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 10) BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร + Kn 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 11) BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร + Kn 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ชิ้นส่วน โดยนำต้นขิงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีความสูง 10 เซนติเมตร คัดเลือกต้นที่มีขนาดลำต้นเทียมเท่า ๆ กัน มาตัดใบและรากออก ให้ต้นมีความสูงประมาณ 1.5 เซนติเมตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง 10 มิลลิลิตร ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตตามกรรมวิธีทดลอง เพาะเลี้ยงต้นในห้องควบคุมที่ได้รับแสง 24 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

บันทึกผลการทดลองและวิเคราะห์อิทธิพลของกรรมวิธีทดลองเช่นเดียวกับการทดลองผลของ BA และ TDZ ต่อการขยายพันธุ์ขิง (หัวข้อ 3.3.1: 1))

3.3.2 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดแคลลัสในขิง

แบ่งเป็น 3 การทดลองย่อย ได้แก่ 1) ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนเหง้าขิง 2) ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนตาขิง และ 3) ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบขิง

1) ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนเหง้าขิง

1.1) ผลของ 2,4-D และ BA ต่อการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนเหง้าขิง

วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล 6 × 4 ในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial 6 × 4 in CRD) โดยมีปัจจัยหลัก 2 ปัจจัย ปัจจัยที่ 1 คือ ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D จำนวน 6 ระดับ ได้แก่ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และปัจจัยที่ 2 คือ ระดับความเข้มข้นของ BA จำนวน 4 ระดับ ได้แก่ 0, 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งหมด 24 กรรมวิธี ดังในตาราง 3.2 แต่ละกรรมวิธีมี 15 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ชิ้นส่วน โดยนำเหง้าขิงพันธุ์ขิงใหญ่อายุ 8-9 เดือนมาล้างน้ำให้สะอาด ตัด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ส่วนของตาขิงออกทิ้ง ตัดชิ้นส่วนเหง้าให้มีขนาดประมาณ 3.0×5.0 เซนติเมตร แล้วนำมาทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจาน แล้วล้างน้ำให้สะอาดอีกครั้ง จากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย Clorox® เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม Tween 80 จำนวน 2-3 หยด ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่านานเป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร อีก 3 ครั้งในสภาพปลอดเชื้อ จากนั้นตัดชิ้นส่วนเหง้าขิงเป็นให้มีขนาด 1.0×1.0×0.2 เซนติเมตร นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง 10 มิลลิลิตร ที่มี 2,4-D และ/หรือ BA ตามกรรมวิธีการทดลอง เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเหง้าขิงในที่มืด 24 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

บันทึกผลการทดลอง โดยบันทึกข้อมูลดังนี้

- สัปดาห์ที่เกิดแคลลัส
- ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแคลลัส
- เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส
- สีแคลลัส โดยกำหนดเกณฑ์การให้คะแนน ดังนี้

  คะแนน 1 คือ สีขาว

  คะแนน 2 คือ สีขาวปนเหลือง

  คะแนน 3 คือ สีขาวปนน้ำตาล
- การเกาะตัวของแคลลัส โดยกำหนดเกณฑ์การให้คะแนน ดังนี้

  คะแนน 1 คือ เกาะตัวหลวมมาก

  คะแนน 2 คือ เกาะตัวหลวม

  คะแนน 3 คือ เกาะตัวแน่น

วิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยหลักและปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทั้งสองโดยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.2 กรรมวิธีการทดลองผลของ 2,4-D และ BA ต่อการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนเหง้าขิง

BA	2,4-D (มก./ล.)					
(มก./ล.)	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
0.0	กรรมวิธีที่ 1	กรรมวิธีที่ 2	กรรมวิธีที่ 3	กรรมวิธีที่ 4	กรรมวิธีที่ 5	กรรมวิธีที่ 6
1.0	กรรมวิธีที่ 7	กรรมวิธีที่ 8	กรรมวิธีที่ 9	กรรมวิธีที่ 10	กรรมวิธีที่ 11	กรรมวิธีที่ 12
3.0	กรรมวิธีที่ 13	กรรมวิธีที่ 14	กรรมวิธีที่ 15	กรรมวิธีที่ 16	กรรมวิธีที่ 17	กรรมวิธีที่ 18
5.0	กรรมวิธีที่ 19	กรรมวิธีที่ 20	กรรมวิธีที่ 21	กรรมวิธีที่ 22	กรรมวิธีที่ 23	กรรมวิธีที่ 24

1.2) ผลของ 2,4-D และ TDZ ต่อการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนเหง้าขิง

วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล 6 × 4 ในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial 6 × 4 in CRD) โดยมีปัจจัยหลัก 2 ปัจจัย ปัจจัยที่ 1 คือ ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D จำนวน 6 ระดับ ได้แก่ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และปัจจัยที่ 2 คือ ระดับความเข้มข้นของ TDZ จำนวน 4 ระดับ ได้แก่ 0., 0.25, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งหมด 24 กรรมวิธี ดังในตารางที่ 3.3 แต่ละกรรมวิธีมี 15 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ชิ้นส่วน โดยนำเหง้าขิงพันธุ์ขิงใหญ่อายุ 8-9 เดือนมาล้างน้ำให้สะอาด ตัดส่วนของตาขิงออกทิ้ง ตัดชิ้นส่วนเหง้าให้มีขนาดประมาณ 3.0×5.0 เซนติเมตร แล้วมาทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจาน แล้วล้างน้ำให้สะอาดอีกครั้ง จากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย Clorox® เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม Tween 80 จำนวน 2-3 หยด ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่านาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร อีก 3 ครั้งในสภาพปลอดเชื้อ จากนั้นตัดชิ้นส่วนเหง้าขิงเป็นให้มีขนาด 1.0×1.0×0.2 เซนติเมตร นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง 10 มิลลิลิตร ที่มี 2,4-D และ/หรือ TDZ ตามกรรมวิธีทดลอง เพาะเลี้ยงในที่มืด 24 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

บันทึกผลการทดลองและวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยหลักและปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทั้งสองเช่นเดียวกับการทดลองผลของ 2,4-D และ BA ต่อการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนเหง้าขิง (หัวข้อ 3.3.2: 1): 1.1))

ตารางที่ 3.3 กรรมวิธีการทดลองผลของ 2,4-D และ TDZ ต่อการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนเหง้าขิง

TDZ	2,4-D (มก./ล.)					
(มก./ล.)	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
0.00	กรรมวิธีที่ 1	กรรมวิธีที่ 2	กรรมวิธีที่ 3	กรรมวิธีที่ 4	กรรมวิธีที่ 5	กรรมวิธีที่ 6
0.25	กรรมวิธีที่ 7	กรรมวิธีที่ 8	กรรมวิธีที่ 9	กรรมวิธีที่ 10	กรรมวิธีที่ 11	กรรมวิธีที่ 12
0.50	กรรมวิธีที่ 13	กรรมวิธีที่ 14	กรรมวิธีที่ 15	กรรมวิธีที่ 16	กรรมวิธีที่ 17	กรรมวิธีที่ 18
1.00	กรรมวิธีที่ 19	กรรมวิธีที่ 20	กรรมวิธีที่ 21	กรรมวิธีที่ 22	กรรมวิธีที่ 23	กรรมวิธีที่ 24

2) การทดลองผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนตาขิง

2.1) ผลของ 2,4-D และ BA ต่อการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนตาขิง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล 6 × 4 ในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial 6 × 4 in CRD) โดยมีปัจจัยหลัก 2 ปัจจัย ปัจจัยที่ 1 คือ ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D จำนวน 6 ระดับ ได้แก่ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และปัจจัยที่ 2 คือ ระดับความเข้มข้นของ BA จำนวน 4 ระดับ ได้แก่ 0, 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งหมด 24 กรรมวิธี ดังในตารางที่ 3.4 แต่ละกรรมวิธีมี 6 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ชิ้นส่วน โดยนำเหง้าขิงพันธุ์ขิงใหญ่อายุ 8-9 เดือน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องรอจนตาขิงเริ่มงอกหรือตามีสีเขียวนูนขึ้น นำมาล้างน้ำให้สะอาด ตัดส่วนของตาขิงออกจากเหง้า แล้วนำมาทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจาน แล้วล้างน้ำให้สะอาดอีกครั้ง จากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย Clorox® เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม Tween 80 ลงไป 2-3 หยด ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่านาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร อีก 3 ครั้งในสภาพปลอดเชื้อ แล้วตัดตาขิงเป็นชิ้นขนาด 1.0×1.0 เซนติเมตร นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง 10 มิลลิลิตร ที่มี 2,4-D และ/หรือ BA ตามกรรมวิธีทดลอง เพาะเลี้ยงในที่มืด 24 ชั่วโมงต่อวัน ที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

บันทึกผลการทดลองและวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยหลักและปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทั้งสองเช่นเดียวกับการทดลองผลของ 2,4-D และ BA ต่อการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนเหง้าขิง (หัวข้อ 3.3.2: 1): 1.1))

ตารางที่ 3.4 กรรมวิธีการทดลองผลของ 2,4-D และ BA ต่อการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนตาขิง

BA	2,4-D (มก./ล.)					
(มก./ล.)	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
0.0	กรรมวิธีที่ 1	กรรมวิธีที่ 2	กรรมวิธีที่ 3	กรรมวิธีที่ 4	กรรมวิธีที่ 5	กรรมวิธีที่ 6
1.0	กรรมวิธีที่ 7	กรรมวิธีที่ 8	กรรมวิธีที่ 9	กรรมวิธีที่ 10	กรรมวิธีที่ 11	กรรมวิธีที่ 12
3.0	กรรมวิธีที่ 13	กรรมวิธีที่ 14	กรรมวิธีที่ 15	กรรมวิธีที่ 16	กรรมวิธีที่ 17	กรรมวิธีที่ 18
5.0	กรรมวิธีที่ 19	กรรมวิธีที่ 20	กรรมวิธีที่ 21	กรรมวิธีที่ 22	กรรมวิธีที่ 23	กรรมวิธีที่ 24

2.2) ผลของ 2,4-D และTDZ ต่อการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนตาขิง

วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล 6 × 4 ในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial 6 × 4 in CRD) โดยมีปัจจัยหลัก 2 ปัจจัย ปัจจัยที่ 1 คือ ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D จำนวน 6 ระดับ ได้แก่ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และปัจจัยที่ 2 คือ ระดับความเข้มข้นของ TDZ จำนวน 4 ระดับ ได้แก่ 0, 0.25, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งหมด 24 กรรมวิธี ดังตารางที่ 3.5 แต่ละ

กรรมวิธีมี 6 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ชิ้นส่วน โดยนำเหง้าขิงพันธุ์ขิงใหญ่อายุ 8-9 เดือน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องรอจนตาขิงเริ่มงอกหรือตามีสีเขียวนูนขึ้น นำมาล้างน้ำให้สะอาด ตัดส่วนของตาขิงออกจากเหง้า แล้วนำมาทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจาน แล้วล้างน้ำให้สะอาดอีกครั้ง จากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย Clorox® เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม Tween 80 ลงไป 2-3 หยด ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่านาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร อีก 3 ครั้งในสภาพปลอดเชื้อ แล้วตัดเป็นชิ้นขนาด 1.0×1.0 เซนติเมตร นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง 10 มิลลิลิตร ที่มี 2,4-D และ/หรือ TDZ ตามกรรมวิธีทดลอง เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาขิงในที่มืด 24 ชั่วโมงต่อวัน ที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

บันทึกผลการทดลองและวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยหลักและปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทั้งสองเช่นเดียวกับการทดลองผลของ 2,4-D และ BA ต่อการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนเหง้าขิง (หัวข้อ 3.3.2: 1): 1.1))

ตารางที่ 3.5 กรรมวิธีการทดลองผลของ 2,4-D และ TDZ ต่อการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนตาขิง

TDZ	2,4-D (มก./ล.)					
(มก./ล.)	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
0.00	กรรมวิธีที่ 1	กรรมวิธีที่ 2	กรรมวิธีที่ 3	กรรมวิธีที่ 4	กรรมวิธีที่ 5	กรรมวิธีที่ 6
0.25	กรรมวิธีที่ 7	กรรมวิธีที่ 8	กรรมวิธีที่ 9	กรรมวิธีที่ 10	กรรมวิธีที่ 11	กรรมวิธีที่ 12
0.50	กรรมวิธีที่ 13	กรรมวิธีที่ 14	กรรมวิธีที่ 15	กรรมวิธีที่ 16	กรรมวิธีที่ 17	กรรมวิธีที่ 18
1.00	กรรมวิธีที่ 19	กรรมวิธีที่ 20	กรรมวิธีที่ 21	กรรมวิธีที่ 22	กรรมวิธีที่ 23	กรรมวิธีที่ 24

3) ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบขิง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ทั้งหมด 10 กรรมวิธี ได้แก่ 1) ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (กรรมวิธีควบคุม) 2) 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร 3) 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 4) 2,4-D 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 5) Dicamba 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร 6) Dicamba 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร 7) Dicamba 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 8) 2,4-D 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร + Dicamba 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร 9) 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + Dicamba 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 10) 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + Dicamba 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ชิ้นส่วน โดยนำใบอ่อนของขิงที่ได้จากต้นที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ มาตัดเป็นชิ้นขนาด 0.5×1.0 เซนติเมตร แล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง 10 มิลลิลิตร ที่มี 2,4-D และ/หรือ Dicamba ตามกรรมวิธีทดลอง เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบขิงในที่มืด 24 ชั่วโมงต่อวัน ที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

บันทึกผลการทดลองและวิเคราะห์อิทธิพลของกรรมวิธีทดลองเช่นเดียวกับการทดลองผลของ 2,4-D และ BA ต่อการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนเหง้าขิง (หัวข้อ 3.3.2: 1): 1.1))

3.3.3 การศึกษาการชักนำให้เกิดการสร้างเหง้าขิงในสภาพปลอดเชื้อ

1) ผลของน้ำตาลซูโครส ระยะเวลาการให้แสง และผงถ่านกัมมันต์ ต่อการสร้างเหง้าขิง

วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล 4 × 3 × 2 ในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial 4 × 3 × 2 in CRD) โดยมีปัจจัยหลัก 3 ปัจจัย ปัจจัยที่ 1 คือ ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส จำนวน 4 ระดับ ได้แก่ 3, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ปัจจัยที่ 2 คือ ระยะเวลาที่ต้นได้รับแสงสีขาวจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ที่ 3 ระยะเวลา ได้แก่ 0, 16 และ 24 ชั่วโมง และปัจจัยที่ 3 คือ ปริมาณผงถ่านกัมมันต์ จำนวน 2 ระดับ ได้แก่ 0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งหมด 24 กรรมวิธี ดังตารางที่ 3.6 แต่ละกรรมวิธีมี 8 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ชิ้นส่วน โดยนำต้นขิงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีความสูง 10 เซนติเมตร คัดเลือกต้นที่มีขนาดลำต้นเทียมเท่า ๆ กัน มาตัดใบและรากออกให้ต้นมีความสูงประมาณ 1.5 เซนติเมตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง 10 มิลลิลิตร ที่มี BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและให้ได้รับปัจจัยต่าง ๆ ตามกรรมวิธีทดลอง เพาะเลี้ยงต้นในห้องควบคุมที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และมีความเข้มแสง 3,000 ลักซ์

บันทึกผลการทดลอง ได้แก่ จำนวนยอดใหม่ ความสูง จำนวนใบ และการเกิดเหง้า โดยสุ่มต้นที่มีความสมบูรณ์และคิดอัตราส่วนของเส้นผ่าศูนย์กลางของส่วนโคนที่กว้างที่สุดต่อเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นเทียม และคิดเปอร์เซ็นต์การเกิดเหง้าจากอัตราส่วนดังกล่าวที่มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 2 (ดัดแปลงจาก Saos *et al.,* 2001) วิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยหลักและปฏิสัมพันธ์ของปัจจัยทั้งสามโดยวิธี ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างข้อมูลต่าง ๆ โดยวิธี Pearson

ตารางที่ 3.6 กรรมวิธีการทดลองผลของน้ำตาลซูโครส ระยะเวลาการให้แสง และผงถ่านกัมมันต์ ต่อการสร้างเหง้าขิง

แสง (ชั่วโมง)	AC (%)	น้ำตาลซูโครส (%)			
		3	6	8	10
0	0.0	กรรมวิธีที่ 1	กรรมวิธีที่ 2	กรรมวิธีที่ 3	กรรมวิธีที่ 4
	0.5	กรรมวิธีที่ 5	กรรมวิธีที่ 6	กรรมวิธีที่ 7	กรรมวิธีที่ 8
16	0.0	กรรมวิธีที่ 9	กรรมวิธีที่ 10	กรรมวิธีที่ 11	กรรมวิธีที่ 12
	0.5	กรรมวิธีที่ 13	กรรมวิธีที่ 14	กรรมวิธีที่ 15	กรรมวิธีที่ 16
24	0.0	กรรมวิธีที่ 17	กรรมวิธีที่ 18	กรรมวิธีที่ 19	กรรมวิธีที่ 20
	0.5	กรรมวิธีที่ 21	กรรมวิธีที่ 22	กรรมวิธีที่ 23	กรรมวิธีที่ 24

2) ผลของชนิดของแสงและน้ำตาลซูโครสต่อการสร้างเหง้าขิง

วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล 4 × 4 ในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial 4 × 4 in CRD) โดยมีปัจจัยหลัก 2 ปัจจัย ปัจจัยที่ 1 คือ ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส จำนวน 4 ระดับ ได้แก่ 3, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ และปัจจัยที่ 2 คือ แสงจากหลอดไฟ 4 ชนิดที่ให้แก่ต้น ได้แก่ แสงสีขาวจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (fluorestcent tube) ความเข้มแสง 2,580 ลักซ์ แสงสีขาวจากหลอด LED ความเข้มแสง 3,010 ลักซ์ แสงสีแดงจากหลอด LED ความเข้มแสง 350 ลักซ์ และแสงสีน้ำเงินร่วมกับแสงสีแดงจากหลอด LED ความเข้มแสง 420 ลักซ์ รวมทั้งหมด 16 กรรมวิธี ดังตารางที่ 3.7 แต่ละกรรมวิธีมี 8 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ชิ้นส่วน โดยนำต้นขิงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีความสูง 10 เซนติเมตร คัดเลือกต้นที่มีขนาดลำต้นเทียมเท่า ๆ กัน มาตัดใบและรากออก ให้ต้นมีความสูงประมาณ 1.5 เซนติเมตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง 10 มิลลิลิตร ที่มี BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และได้รับปัจจัยต่าง ๆ ตามกรรมวิธีทดลอง เพาะเลี้ยงต้นในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

บันทึกผลการทดลองและวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยหลักและปฏิสัมพันธ์ของปัจจัยทั้งสอง รวมถึงวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เช่นเดียวกับการทดลองผลของน้ำตาลซูโครส ระยะเวลาการให้แสง และผงถ่านกัมมันต์ ต่อการสร้างเหง้าขิงในสภาพปลอดเชื้อ (หัวข้อ 3.3.3: 1))

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.7 กรรมวิธีการทดลองผลของชนิดของแสงและน้ำตาลซูโครสต่อการสร้างเหง้าขิง

ชนิดแสง	น้ำตาลซูโครส (%)			
	3	6	8	10
สีขาวหลอดฟลูออเรสเซนต์	กรรมวิธีที่ 1	กรรมวิธีที่ 2	กรรมวิธีที่ 3	กรรมวิธีที่ 4
สีขาวหลอด LED	กรรมวิธีที่ 5	กรรมวิธีที่ 6	กรรมวิธีที่ 7	กรรมวิธีที่ 8
สีแดงหลอด LED	กรรมวิธีที่ 9	กรรมวิธีที่ 10	กรรมวิธีที่ 11	กรรมวิธีที่ 12
สีน้ำเงิน LED +สีแดง LED	กรรมวิธีที่ 13	กรรมวิธีที่ 14	กรรมวิธีที่ 15	กรรมวิธีที่ 16

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved