

## บทที่ 2

### อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

การศึกษาการเจริญเติบโตและการออกดอกภายใต้อิทธิพลของช่วงเวลากลางวัน (photoperiod) ต่าง ๆ ในวิทยานิพนธ์มีดังนี้

#### การเตรียมพืชทดลอง

พืชทดลองที่ใช้คือ Spirodela polyrhiza (Linn.) Schleid Syn. Lemna polyrhiza Linn. การศึกษาครั้งนี้ เลี้ยงแทนในสภาพปลอดเชื้อตลอดการทดลอง ใช้วิธีการดังนี้ คือ

เลือกแทนจากแหล่งน้ำในธรรมชาติ โดยเลือกกลุ่มที่มี 2-3 ต้น ล้างด้วย deionized water 2-3 ครั้ง แล้วนำไปแช่ในคลอโรกซ์ 5% นาน 5 นาที ขณะที่แช่เขย่าขวดทุก ๆ 30 วินาที แล้วล้างด้วย deionized water ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วอีก 3 ครั้ง ใช้ปากคีบย้ายเอา แทนเหล่านี้ใส่ลงในขวดแก้วรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 125 มิลลิลิตร มีสารอาหารตามสูตรของ Hoagland + sucrose 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (Hillman, 1959) จำนวน 50 มิลลิลิตร ปิดขวดแก้วรูปชมพู่ด้วยแผ่นอลูมิเนียม (aluminum foil) เลี้ยงแทนในห้องทดลอง โดยให้ได้รับช่วงเวลากลางวัน 12 ชั่วโมง ในวงจร 24 ชั่วโมง ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 50-70 เปอร์เซ็นต์

เมื่อเลี้ยงแทนได้ 2 สัปดาห์ ย้ายแทนจำนวน 5-10 ต้นไปเลี้ยงในสารอาหารชนิดเดิม ในขวดแก้วรูปชมพู่ใบใหม่ นำไปเลี้ยงไว้ในห้องทดลองที่มีสภาพดังได้กล่าวมาแล้ว เพื่อใช้เป็น stock culture ทำดังนี้ทุก ๆ 2 สัปดาห์

แทนที่นำมาใช้ทุกการทดลองในวิทยานิพนธ์นี้ นำมาจาก stock culture ที่มีอายุ ระหว่าง 20-28 วัน



สารอาหาร น้ำกลั่น และเครื่องมือที่ใช้ตลอดการทดลองได้รับการฆ่าเชื้อ โดยผ่านการอบด้วยไอน้ำที่ความดัน 1.2 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร นาน 10 นาที และตลอดการทดลองในวิทยานิพนธ์นี้ใช้ aseptic technique โดยแบ่งการทดลองออกเป็นขั้นตอนดังนี้

1. ศึกษาการเจริญเติบโตและการออกดอกของแหนในสารอาหารตามสูตรของ Hoagland + sucrose 1% ในช่วงเวลาการให้แสงต่าง ๆ กัน

เนื่องจาก stock culture ที่ใช้ในการทดลองนี้ เจริญเติบโตในสารอาหารตามสูตรของ Hoagland + sucrose 1% จึงได้ศึกษาว่าในสารอาหารชนิดนี้ เมื่อใช้ช่วงเวลาการให้แสงต่าง ๆ จะมีผลต่อการเจริญเติบโตและการออกดอกของแหนหรือไม่ โดยเริ่มเลี้ยงแหนจากกลุ่มที่มี 3 ต้น (3-frond colonies) 1 กลุ่ม ในขวดแก้วรูปชมพู่ โดยใช้สารอาหารตามสูตรของ Hoagland + sucrose 1% ดังที่กล่าวมาแล้ว การควบคุมช่วงเวลาการให้แสงตลอดการศึกษานี้ ใช้กล่องสีเหลี่ยมซึ่งทำด้วยไม้อัดหนา 8 มิลลิเมตรขนาด 62x62x65 เซนติเมตร ภายในกล่องด้านบนติดหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ชนิด cool white ขนาด 15 วัตต์ 2 หลอด ความเข้มแสงที่พื้นผิวภายในกล่องที่ใช้เลี้ยงแหน ประมาณ 750 ลักซ์ อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ช่วงเวลาการให้แสงที่ใช้คือ 8 10 12 และ 14 ชั่วโมง และช่วงแสงตามธรรมชาติ (ในเรือนต้นไม้) ซึ่งมีความเข้มแสงประมาณ 108,000 ลักซ์ และคอยเขย่าขวดแก้วรูปชมพู่ที่เลี้ยงแหนทุกวัน วันละ 1 ครั้ง

เนื่องจากในการศึกษานี้ เลี้ยงแหนอายุต่าง ๆ กัน จึงใช้ขวดแก้วรูปชมพู่หลายขนาด และบรรจุสารอาหารปริมาณต่าง ๆ กันดังนี้

ขนาด 125 มิลลิลิตร	สำหรับแหนที่เก็บผลเมื่ออายุ 7 และ 14 วัน	บรรจุสารอาหาร 50 มิลลิลิตร
ขนาด 150 มิลลิลิตร	สำหรับแหนที่เก็บผลเมื่ออายุ 21 วัน	บรรจุสารอาหาร 65 มิลลิลิตร
ขนาด 200 มิลลิลิตร	สำหรับแหนที่เก็บผลเมื่ออายุ 28 และ 35 วัน	บรรจุสารอาหาร 75 มิลลิลิตร
ขนาด 250 มิลลิลิตร	สำหรับแหนที่เก็บผลเมื่ออายุ 42 วัน	บรรจุสารอาหาร 85 มิลลิลิตร

ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ทุก ๆ อายุของแหน และทุกช่วงเวลาการให้แสงที่ใช้

วัดผลการเจริญเติบโตและการออกดอกของแทน ทุกช่วงเวลาการให้แสงที่ใช้เป็นระยะ ๆ ทุก 7 วัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยการชั่งน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และนับจำนวนต้นและจำนวนดอก รวมทั้งเปอร์เซ็นต์การออกดอกต่อจำนวนต้น เพื่อหาช่วงเวลาการให้แสงที่เหมาะสมที่สุด ต่อการเจริญเติบโตของแทน

2. ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมะพร้าวในการเจริญเติบโตและการออกดอกของแทนในสารอาหารตามสูตรของ Hoagland + sucrose 1% ในช่วงเวลาการให้แสง 12 ชั่วโมง

ผลจากการทดลองในข้อ 1 พบว่า ช่วงเวลาการให้แสง 12 ชั่วโมง แทนมีการเจริญเติบโตที่ดีที่สุด และถ้าใช้แทนจำนวน 3 ต้น จะทำให้แทนมีจำนวนมากเกินไป เมื่ออายุได้ 42 วัน ฉะนั้นการทดลองในขั้นนี้ จึงเลี้ยงแทนโดยเริ่มจากกลุ่มที่มี 2 ต้น 1 กลุ่ม เลี้ยงในสารอาหารตามสูตรของ Hoagland + sucrose 1% + น้ำมะพร้าว โดยใช้ น้ำมะพร้าวเข้มข้น 5 10 15 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เลี้ยงไว้ในกล่องควบคุมช่วงเวลาการให้แสง เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ให้ได้ช่วงเวลาการให้แสง 12 ชั่วโมง

ทำการทดลอง 2 ซ้ำ และวัดผลการทดลองแบบเดียวกับข้อ 1

3. ศึกษาการเจริญเติบโตและการออกดอกของแทนในสารอาหารตามสูตรของ Hoagland + sucrose 1% + น้ำมะพร้าว 15% ในช่วงเวลาการให้แสงต่าง ๆ กัน

จากการทดลองในข้อ 2 พบว่า ในสารอาหารที่มีน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ ทำให้แทนมีการเจริญเติบโตและการออกดอกได้ดีที่สุด ฉะนั้นการทดลองในขั้นนี้ จึงใช้สารอาหารตามสูตรของ Hoagland + sucrose 1% + น้ำมะพร้าว 15% และใช้แทนกลุ่มที่มี 2 ต้น 1 กลุ่ม นำไปเลี้ยงในกล่องควบคุมช่วงเวลาการให้แสงให้ได้รับช่วงเวลาการให้แสง 8 10 12 14 และ 16 ชั่วโมงตามลำดับ ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เลี้ยงแทนไว้เป็นเวลา 6 สัปดาห์ วัดผลการทดลองแบบเดียวกับข้อ 1

4. ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ kinetin ในการเจริญเติบโตและการออกดอกของแทนในสารอาหารตามสูตรของ Hoagland + sucrose 1% ในช่วงเวลาการให้แสง 12 ชั่วโมง

เลี้ยงแทนโดยเริ่มจากกลุ่มที่มี 2 ต้น 1 กลุ่ม ในสารอาหารตามสูตรของ Hoagland + sucrose 1% + kinetin โดยใช้ kinetin เข้มข้น 0.05 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 ppm. ตามลำดับ ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เลี้ยงไว้ในกล่องควบคุมช่วงเวลาการให้แสงให้ได้รับช่วงเวลาการให้แสง 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 6 สัปดาห์ วัดผลการทดลองแบบเดียวกับข้อ 1

5. ศึกษาการเจริญเติบโตและการออกดอกของแทนในสารอาหารตามสูตรของ Hoagland + sucrose 1% + kinetin 0.05 ppm. ในช่วงเวลาการให้แสงต่าง ๆ กัน

ผลจากการทดลองในข้อ 4 พบว่า ในสารอาหารที่มี kinetin อยู่ 0.5 ppm. ทำให้แทนมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด แต่สารอาหารที่มี kinetin 0.05 ppm. ก็สามารถทำให้เห็นความแตกต่างระหว่างแทนที่ได้รับ kinetin กับแทนที่ไม่ได้รับ kinetin แล้ว ฉะนั้นการทดลองในขั้นนี้ จึงใช้สารอาหารตามสูตรของ Hoagland + sucrose 1% + kinetin 0.05 ppm. และใช้แทนจากกลุ่มที่มี 2 ต้น 1 กลุ่ม นำไปเลี้ยงในกล่องควบคุมช่วงเวลาการให้แสง ให้ได้รับช่วงเวลาการให้แสง 8 10 12 14 และ 16 ชั่วโมงตามลำดับ ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เลี้ยงแทนไว้เป็นเวลา 6 สัปดาห์ วัดผลการทดลองแบบเดียวกับข้อ 1