บทที่ 3

วิธีการวิจัย

1. ลักษณะอาการ ความรุนแรงของโรคและการตรวจสอบไวรัสในกุหลาบ

การทดลองที่ 1 ลักษณะอาการของต้นกุหลาบที่เป็นโรคไวรัส

สำรวจกุหลาบจากแหล่งปลูกและแหล่งจำหน่ายในจังหวัดเชียงใหม่ เช่น ตลาดดำเที่ยง สถานีวิจัยเกษตรหลวงอ่างขาง ทุ่งเริง อินทนนท์ ปางดะ และจังหวัดเพชรบูรณ์ ตากเชียงราย พร้อมกับบันทึกภาพอาการที่ส่วนต่าง ๆ ของกุหลาบที่เป็นโรค โดยเน้นอาการที่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า

การทดลองที่ 2 ลักษณะโครงสร้างจุลภาคและ การตรวจสอบไวรัสในกุหลาบที่เป็นโรค

การศึกษาลักษณะโครงสร้างจุลภาคของกุหลาบที่เป็นโรค ใช้วิธีการนำชิ้นส่วนของใบกุหลาบที่แสดงอาการมาผ่านกระบวนการฝังในพลาสติกและตัดเนื้อเยื่อด้วย ultramicrotome ย้อมด้วย lead acetate 0.1% และ uranyl acetate 2% นำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนพร้อมกับบันทึกภาพ ส่วนการทดสอบไวรัสในต้นกุหลาบ จะใช้การบดใบอ่อนของกุหลาบที่เป็นโรคในโกร่งที่แช่เย็นจัด โดยใช้บัฟเฟอร์ 3 ชนิด อัตรา 1: 20 (w/v) บัฟเฟอร์ที่ใช้มีดังนี้

ชนิดที่ 1 0.1 M. potassium phosphate buffer + 0.1 % Na_2SO_3 pH 7.5 (สุรภีและคณะ, 2538)

ชนิดที่ 2 0.03 M. phosphate buffer + 0.02 M. 2-ME pH 8.0 (Fulton, 1967)

ชนิดที่ 3 0.03 M. phosphate buffer + 0.5 % Na_2SO_3 pH 7.0

หลังจากบดเนื้อเยื่อกุหลาบจนละเอียดแล้วนำไปปลูกเชื้อลงบนใบเลี้ยงของพืชทดสอบที่โรยด้วยผง carborundum ขนาด 350 mesh พืชทดสอบที่ใช้มี 6 ชนิด ดังนี้ *Chenopodium amaranticolor Cassia occidentalis Cucumis sativus Momordica balsamina Phaseolus vulgalis* และ *Vigna unguiculata* ล้างใบพืชที่ปลูกเชื้อแล้วด้วยน้ำสะอาดก่อนนำไปเก็บในเรือนทดลอง เพื่อสังเกตอาการ

1. การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นตอกุหลาบ 2 ชนิด

การทดลองที่ 3 สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาตาข้างของต้นตอกุหลาบ

นำกิ่งกุหลาบทั้ง 2 ชนิดที่มีตาข้าง ขนาดประมาณ 3 cm. ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นที่ผสม detergent ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวภายนอกด้วย ethanol 70% นาน 10 นาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อต่อด้วย clorox 15% ที่ผสม Tween-20 2 หยด อีก 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วอีก 3 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที นำชิ้นส่วนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาวางบนกระดาษกรองเพื่อซับให้แห้งก่อนที่จะตัดส่วนของตาข้างมาเลี้ยงบนสูตรอาหารสังเคราะห์ 3 สูตร ดังนี้

สูตรที่ 1 : MS ไม่ผสมฮอร์โมน pH 5.7

สูตรที่ 2 : MS + BAP 0.0015 ppm. + sucrose 3% pH 5.5 (Sallanon and Maziere, 1992)

สูตรที่ 3 : MS + BAP 0.20 ppm. + GA_3 0.1 ppm. + sucrose 4 % pH 5.7

แต่ละสูตรทำการทดลอง 25 ซ้ำ บันทึกผล จำนวนของตาข้างที่เจริญเป็นต้นอ่อน การตายและการเปลี่ยนเป็นแคลลัสของตาข้าง

การทดลองที่ 4 สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการขยายชนิดต้นตอกุหลาบ

นำต้นอ่อนของกุหลาบทั้ง 2 ชนิด ที่ได้จากการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อและมีความสูงประมาณ 0.5 cm. มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ 4 สูตร ดังนี้

สูตร A : MS + BAP 0.63 ppm. + NAA 0.01 ppm. + $GA_3$0.1 ppm. + sucrose 4%

สูตร B : MS + BAP 0.5 ppm. + NAA 0.01 ppm. + $GA_3$0.2 ppm. + sucrose 4%

สูตร C : MS + BAP 0.2 ppm. + $GA_3$0.1 ppm. + sucrose 4%

สูตร D : MS + BAP 1 ppm. + IAA 0.05 ppm. + $GA_3$0.2 ppm. + sucrose 4%

แต่ละสูตรทำการทดลอง 20 ซ้ำ บันทึกการเจริญโดยการวัดความสูงของต้นหลัง สีใบ การแตกกอ จำนวนต้นเฉลี่ยที่แตกใหม่ หลังจากเลี้ยงบนอาหารทั้ง 4 สูตร

การทดลองที่ 5 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำต้นกุหลาบให้เกิดราก

นำต้นกุหลาบทั้ง 2 ชนิดที่เจริญในสภาพปลอดเชื้ออายุ 9-10 สัปดาห์ ความสูงประมาณ 1.2-1.5 cm. ทดสอบในอาหาร 2 สูตร ดังนี้

สูตร I : MS + IAA 0.10 ppm. + GA_3 0.10 ppm. (Lloyd *et. al.*,1988)

สูตร II : MS + NAA 0.10 ppm. + GA_3 0.10 ppm. (กาญจนา, 2531)

แต่ละสูตรทำการทดลอง 20 ซ้ำ และบันทึกผลโดยนับ จำนวนต้นที่เกิดราก และ สังเกตลักษณะของรากที่เกิดขึ้น

2. การย้ายปลูกในโรงเรือน

การทดลองที่ 6 การย้ายปลูกในสภาพโรงเรือน

นำต้นกุหลาบที่สร้างรากแล้วจากสภาพปลอดเชื้อมาล้างวุ้นที่ติดมากับต้นอ่อนแล้วจุ่มในฮอร์โมนเร่งราก (เซราดิกซ์ เบอร์ 1) เปรียบเทียบกับการไม่ใช้ฮอร์โมน ซึ่งแต่ละกรรมวิธีจะใช้ต้นอ่อน 25 ต้นมาปลูกวัสดุปลูก (ดินร่วน : ขี้เถ้าแกลบ ในอัตราส่วน 1:6) ที่นึ่งฆ่าเชื้อ และบรรจุอยู่ในถาดเพาะเมล็ด หลังจากนั้นรดน้ำให้ชุ่ม เก็บในตู้ควบคุมที่มีสภาพอุณหภูมิ 25° C ความชื้น 85 % เป็นเวลา 3 สัปดาห์ จึงย้ายมาไว้ในสภาพโรงเรือน บันทึกจำนวนต้นที่รอดชีวิตหลังการย้ายปลูก

3. การผลิตต้นตอกุหลาบปลอดโรคไวรัส ในสภาพปลอดเชื้อ

การทดลองที่ 7 ระยะเวลาการทำ thermotherapy ของต้นตอกุหลาบที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

นำต้นอ่อนกุหลาบที่มีสภาพต้นแข็งแรงและมีระบบรากที่พัฒนาอย่างสมบูรณ์มาเก็บในสภาพอุณหภูมิ 35° C โดยให้ได้รับแสง 16 ชั่วโมง สลับกับสภาพอุณหภูมิ 30° C ในที่มืด 8 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 3 4 5 6 และ 7 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำต้นที่รอดชีวิตมาตัดเนื้อเยื่อเจริญให้ได้ขนาด 0.2-0.3 mm. และเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร C (MS + BAP 0.20 ppm. + GA_3 0.10 ppm. + sucrose 4%) ในที่มืด 2 วันก่อนนำมาเลี้ยงในตู้ควบคุมที่มีสภาพอุณหภูมิ 25°C. ความชื้น 85 % ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

บันทึกผลโดยนับจำนวนต้นที่รอดชีวิตภายหลังการทำ thermotherapy ที่ระยะเวลาต่างๆ พร้อมทั้งนับจำนวนเนื้อเยื่อเจริญที่เจริญเป็นต้นอ่อน การเจริญเป็นแคลลัสและการตายของเนื้อเยื่อเจริญ

การทดลองที่ 8 เปรียบเทียบอัตราการเจริญของต้นกุหลาบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญของต้นที่ทำ thermotherapy ระยะเวลาต่างๆ กับต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตาข้าง

นำต้นอ่อนที่ได้จากการทดลองที่ 7 กับต้นที่ได้จากการพัฒนาของตาข้างที่ใช้เป็นชุดเปรียบเทียบมาเลี้ยงอาหารสังเคราะห์สูตร C (MS + BAP 0.20 ppm.+ GA_3 0.10 ppm. + sucrose 4%) เพื่อสังเกตการเจริญของต้นอ่อนกุหลาบทั้ง 2 กลุ่มในสภาพปลอดเชื้อ บันทึกผลโดยเปรียบเทียบความสูง การแตกกอ และจำนวนต้นเฉลี่ยที่แตกใหม่ต่อกอของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญของต้นที่ทำ thermotherapy ระยะเวลาต่างๆ กับ ชุดเปรียบเทียบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University