บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์

1.เมล็ดของต้นกฤษณาที่ปราศจากโรค

2.อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

2.1 สารเคมี ได้แก่อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร MS (Murashige & Skoog,1962) สารควบคุมการเจริญเติบโตได้แก่ BA(Benzyladenine)และ2,4-D(Dichlorophenoxy acetic acid) สารเคมีที่ใช้กำจัดสิ่งปนเปื้อน ได้แก่ แอลกอฮอล์ คลอรอกซ์ ทวิน 20 ผงซักฟอก

2.2 เครื่องแก้ว ได้แก่ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชปากกว้างขนาด4 ออนซ์พร้อมฝาพลาสติกทนร้อน บีกเกอร์ขนาดต่าง ๆ กระบอกตวง ปิเปตต์ ขวดสีชาใส่สารเคมี กรวยแก้ว จานเลี้ยงเชื้อ ทางแก้วคน

2.3 อุปกรณ์ผ่าตัด ได้แก่ มีดผ่าตัด ปากคีบ

2.4 ครุภัณฑ์ ได้แก่ หม้อนึ่งอัดไอ เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง ตู้อบฆ่าเชื้อ ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ เครื่องชั่งอย่างหยาบ เครื่องชั่งอย่างละเอียด

3.ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งชั้นวางขวด ที่มีความเข้มแสง 1,500-20,000 ลักซ์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน

การวางแผนการวิจัย

วางแผนการวิจัย โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) มี 12 สิ่งทดลอง 4 ซ้ำ รวม 144 ขวด เลี้ยงในสูตรอาหาร MS โดยกำหนดสิ่งทดลองดังนี้

สิ่งทดลองที่ 1 มี BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สิ่งทดลองที่ 2 มี BA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สิ่งทดลองที่ 3 มี BA เข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

สิ่งทดลองที่ 4 มี BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

สิ่งทดลองที่ 5 มี BA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

สิ่งทดลองที่ 6 มี BA เข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

สิ่งทดลองที่ 7 มี BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

สิ่งทดลองที่ 8 มี BA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

สิ่งทดลองที่ 9 มี BA เข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

สิ่งทดลองที่ 10 มี BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร

สิ่งทดลองที่ 11 มี BA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร

สิ่งทดลองที่ 12 มี BA เข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร

วิธีการวิจัย

1.เตรียมอาหารสูตร MS ที่มี BA และ 2,4-D ตามความเข้มข้นที่กำหนด นำเข้าหม้อนึ่งอัดไอเพื่อฆ่าเชื้อ

2.นำเมล็ดกฤษณา มาล้างทำความสะอาดด้วยผงซักฟอก แล้วล้างออกด้วยน้ำประปาจำนวน 2-3 ครั้ง ซับด้วยกระดาษทิชชูให้แห้ง

3.นำมาฟอกฆ่าเชื้อ โดยการแช่เมล็ดลงในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 15 นาที แล้วย้ายแช่ในคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ที่มีทวินผสมอยู่ 1-2 หยด เขย่าเป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบกำหนดล้างคลอรอกซ์ ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

4.แกะเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วนำคัภพะวางเลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆขวดละ 1 ชิ้น นำไปเลี้ยงไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเวลา 60 วัน โดยการเปลี่ยนอาหารสูตรเดิมทุก 15 วัน

การบันทึกข้อมูล

1.เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต โดยใช้วิธีสังเกตชิ้นส่วนพืชต้องปราศจากการติดเชื้อและไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือสีดำ บันทึกเป็นขวด ในแต่ละสิ่งทดลอง จากนั้นนำมาคิดเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์

2.การเกิดแคลลัส โดยใช้วิธีสังเกตชิ้นส่วนพืชที่มีชีวิต และมีการแบ่งเซลล์ เกิดเป็นกลุ่มเนื้อเยื่อที่เรียกว่าแคลลัส บันทึกลักษณะของกลุ่มแคลลัสที่เกิดขึ้น บันทึกสี ขนาด ของแคลลัสที่เกิดเพิ่มขึ้นจากเนื้อเยื่อเดิม โดยการสังเกตุด้วยระดับสายตาให้คะแนนเฉลี่ยเป็น 3 ระดับคือ

* หมายถึง มีแคลลัสโตขึ้นประมาณ 1 เท่าของชิ้นเนื้อเยื่อเดิม

** หมายถึง มีแคลลัสโตขึ้นประมาณ 2 เท่าของชิ้นเนื้อเยื่อเดิม

* ** หมายถึง มีแคลลัสโตขึ้นประมาณ 3 เท่าของชิ้นเนื้อเยื่อเดิม

3.การเกิดยอด นับจำนวนยอดที่เกิดขึ้นในแต่ละขวดที่ทำการทดลอง

4.จำนวนใบ นับจำนวนใบที่เกิดขึ้นในแต่ละขวดที่ทำการทดลอง

สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

อาคารปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันราชภัฏสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา

เริ่มทำการทดลอง ธันวาคม2545 สิ้นสุดการทดลอง ตุลาคม 2546