บทที่ 3
วิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์

1.สารเคมี ได้แก่ อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS (Murashige and Skoog,1962) สารควบคุมการเจริญเติบโต BA (6-benzyladenine) IAA (Indole-3-acetic acid) NAA (1-Naphtalene acetic acid) และ iBA (Indole –3- bytric acid) สารเคมีที่ใช้ในการกำจัดสิ่งปนเปื้อน ได้แก่ คลอรอกซ์ ทวิน20 แอลกอฮอล์ เบนเลท ผงซักฟอก

2.เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชปากกว้างขนาด 4 ออนด์ พร้อมฝาพลาสติกใสทนร้อน บีกเกอร์ขนาดต่างๆ กระบอกตวง ปิเปตต์ ขวดใส่สารเคมี สีชา กรวยแก้ว จานเลี้ยงเชื้อ แท่งแก้วคน

3.อุปกรณ์ผ่าตัด ได้แก่ มีดผ่าตัด ปากคีบ

4.ครุภัณฑ์ ได้แก่ หม้อนึ่งอัดไอ ตู้อบ ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง เครื่องกลั่นน้ำ เครื่องชั่งอย่างหยาบ เครื่องชั่งอย่างละเอียดชนิดจุดทศนิยม 4 ตำแหน่ง กล้องถ่ายรูป

5.วัสดุปลูก ได้แก่ ทราย แกลบ ขุยมะพร้าว แก้วพลาสติก ถุงเพาะชำ ปุ๋ยเคมี สูตร 15-15-15

6.ชิ้นส่วนพืช ได้แก่ ตายอดและตาข้างของสบู่เลือดเถาว์

7.ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,500-2,000 ลักซ์ ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน

วิธีการทดลอง

1.การวางแผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ Factorial in Completely Randomized Design (CRD) แบ่งการทดลองแบ่งออก 4 ตอนคือ

1.1 การชักนำให้เนื้อเยื่อพืชเกิดต้นรวม โดยศึกษาระดับความเข้มข้นของ BA และ IAA ที่เหมาะสม ในการชักนำให้เนื้อเยื่อเจริญบริเวณตายอดและตาข้างของ

สบู่เลือดเถาว์เกิดต้นรวม ใช้อาหารสูตร MS โดยมี BA เข้มข้น 0,1,2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น 0.00 ,0.05 และ 0.10 มิลลิกรัมต่อลิตร มีทั้งหมด 12 สิ่งทดลอง แต่ละสิ่งทดลองมี 4 ซ้ำ ๆละ 10 ขวดเป็นเวลา 3 เดือน

1.2 การชักนำให้เนื้อเยื่อเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ โดยนำเนื้อเยื่อที่เจริญเติบโต มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS มี BA และ IAA ที่เหมาะสมเป็นเวลา 2 เดือน

1.3 การชักนำให้เกิดราก โดยศึกษาระดับความเข้มข้นของ IAA IBA และ NAA ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดราก ใช้ระดับความเข้มข้น 0.1 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 เดือน

1.4 นำมาปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก

2. การดำเนินการทดลอง

2.1 การเตรียมชิ้นส่วนพืช คัดเลือกตายอดและตาข้างของสบู่เลือดเถาว์ที่สมบูรณ์โดยใช้ตาที่ 1-6 นำมาฟอกทำความสะอาด โดยใช้ผงซักฟอก และล้างด้วยน้ำประปา 3-4 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู ตัดแต่งกิ่งเป็นท่อน ๆโดยให้แต่ละท่อนมีตาติดอยู่ 1-2 ตา

2.2 การเตรียมอาหาร เตรียมอาหารสูตร MS โดยมี BA ร่วมกับ IAA ทั้งหมด 12 สิ่งทดลอง ตั้งแต่สิ่งทดลองที่ 1-12 มีดังนี้คือ BA+IAA 0.0+0.0 1.0+0.0 2.0+0.0 3.0+0.0 0.0+0.01 1.0+0.01 2.0+0.01 3.0+0.01 0.0+1.0 1.0+0.1 2.0+0.1 และ 3.0+0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สิ่งทดลองละ 40 ขวด ขวดละ 20 มิลลิลิตร

2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่เลือดเถาว์ นำตายอดและตาข้างของสบู่เลือดเถาว์มาฟอกฆ่าเชื้อ โดยจุ่มในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 วินาที ย้ายมาฟอกในคลอรอกซ์ 10 เปอเซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ตัดแต่งเนื้อเยื่อ วางเลี้ยงในสูตรอาหารต่าง ๆ ขวดละ 1 ชิ้น

2.4 นำเข้าห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 25 - 27 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,500-2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน เปลี่ยนอาหาร ทุก 15 วัน โดยใช้อาหารสูตรเดิม

2.5 การชักนำให้เกิดราก

2.6 การเตรียมอาหาร เตรียมอาหารสูตร MS โดยมี IAA IBA และ NAA ทั้งหมด 9 สิ่งทดลอง ดังนี้ IAA 0.1 IAA 0.5 IAA 1.0 IBA 0.1 IBA 0.5 IBA 1.0 NAA 0.1 NAA 0.5 และ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สิ่งทดลองละ 40 ขวด ขวดละ 20 มิลลิลิตร

2.7 นำตายอดและตาข้างที่เจริญเติบโตสมบูรณ์ ตัดแต่งให้มีขนาดความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร วางเลี้ยงในสูตรอาหารต่าง ๆ ขวดละ 1 ชิ้น เป็นเวลา 6 เดือน เปลี่ยนอาหารทุก 1 เดือน โดยใช้อาหารสูตรเดิม

2.8 นำต้นที่งอกรากแล้วออกจากขวดเพาะเลี้ยง มาเลี้ยงในวัสดุปลูกสภาพแวดล้อมภายนอก โดยมีวิธีการดังนี้คือ

2.8.1 เตรียมวัสดุปลูกใช้ ทราย ใส่ในถ้วยพลาสติก

2.8.2 ใช้ปากคีบดึงต้นออกจากขวด ล้างวุ้นที่ติดมากับต้นพืชออกให้หมด ล้างด้วยน้ำประปา 3-4 ครั้ง นำต้นแช่ในยาฆ่าเชื้อรานาน 15 นาที แล้วปลูกในวัสดุที่เตรียมไว้ วางเลี้ยงในเรือนเพาะชำมีตาข่ายพรางแสง 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 วัน ให้น้ำทุกวัน วันละ 1 ครั้ง

2.8.3 ย้ายต้นที่เจริญเติบโตลงปลูกในวัสดุปลูก ที่ประกอบด้วย ทราย ขุยมะพร้าว แกลบ อัตราส่วน 1:1:1 ซึ่งบรรจุในถุงเพาะชำ ให้น้ำทุกวัน วันละ 1 ครั้งใส่ปุ๋ยทุก 30 วัน

3. การบันทึกข้อมูล การเก็บข้อมูลแบ่งออกดังนี้

3.1 ศึกษาระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ IAA ที่เหมาะสมในการชักนำให้เนื้อเยื่อตายอดและตาข้าง เจริญเติบโตเกิดต้นรวม โดยการสังเกตการเจริญเติบโต นับจำนวนยอดและจำนวนใบที่ได้

3.2 ศึกษาระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA IBA และ NAA ที่เหมาะสมในการชักนำให้ตายอดและตาข้างเกิดรากโดย

3.2.1 วัดความสูงของต้น

3.2.1 นับจำนวนราก

3.2.3 วัดความยาวราก

การวิเคราะห์ข้อมูล โดยการหาค่าเฉลี่ยวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย

4. เวลาและสถานที่

สถานที่ทำการวิจัย คืออาคารปฏิบัติการเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันราชภัฏสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา ระหว่างวันที่ 12 กรกฎาคม 2543-10 กรกฎาคม 2545

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY