บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์

1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบหยาบและละเอียด

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง

หม้อนึ่งความดันไอน้ำ

เครื่องแก้ว และเครื่องพลาสติกชนิดต่างๆ สำหรับเตรียมอาหารและบรรจุอาหาร

1.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)

สารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่

6-benzyl amino purine (BAP)

1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อและถ่ายเนื้อเยื่อพืช

ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อพืช

เครื่องมือผ่าตัดได้แก่ มีดผ่าตัด ปากคีบ จานแก้ว

เครื่องมืออื่นๆ เช่น ตะเกียงแอลกอฮอล์ ขวดบรรจุแอลกอฮอล์

1.4 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ

แอลกอฮอล์

คลอรอกซ์

1.5 น้ำกลั่น

1.6 อุปกรณ์การถ่ายภาพ

1.7 ตาข้างจากต้นในสภาพธรรมชาติ

2. วิธีการ

2.1 ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ด

2.1.1 เลือกผลกลึมกล่อมที่สมบูรณ์

2.1.2 นำไปฟอกในซันไลซ์ประมาณ 5 นาทีแล้วล้างน้ำจนหมดฟอง

2.1.3 ฟอก Colox 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 10 นาที

2.1.4 นำมาล้างน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วซึ่งมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร ประมาณ 5 นาที จนหมดฟอง

2.1.5 นำไปเพาะเลี้ยงลงในอาหาร MS (Murashige & Skoog) โดยเลี้ยงในสภาพห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส

2.1.6 บันทึกผลการงอก และคิดเปอร์เซ็นต์การงอก

$$\text{เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่งอก}}{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมด}} \times 100$$

2.2 การศึกษาผลของ BAP (6-benzyl amino purine) ต่อการเพิ่มความยาวยอดและจำนวนยอดของกลึงกล่อม ในสภาพปลอดเชื้อ

นำยอดกลึงกล่อมที่มีความสมบูรณ์ดี จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดมาเพิ่มปริมาณยอดในอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และย้ายยอดมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นจึงนำยอดมาทำการทดลองบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.3 การศึกษาผลของ BAP (6-benzyl amino purine) ต่อการเพิ่มความยาวยอดและจำนวนยอดของกลึงกล่อม ในสภาพปลอดเชื้อ

นำยอดอ่อนของกลึงกล่อมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนเมล็ด ในสภาพปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP (6-benzyl aminopurine) ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร และเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกัน เป็นเวลา 120 วัน โดยเปลี่ยนอาหารทุก 14 วัน เพาะเลี้ยงในสภาพห้อง

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 27 ± 1 องศาเซลเซียส และบันทึกจำนวนยอดที่เพิ่มขึ้น และขนาดยอดที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง

จำนวนยอดที่เพิ่มขึ้นในวันที่ 120 = จำนวนยอดในวันที่ 120 - จำนวนยอดเริ่มต้น

เปอร์เซ็นต์จำนวนยอดที่เพิ่มขึ้นในวันที่ 120 เทียบกับชุดควบคุม

$$= \frac{\text{จำนวนยอดที่เพิ่มขึ้นในวันที่ 120}}{\text{จำนวนยอดเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นในวันที่ 120 ของชุดควบคุม}} \times 100$$

ความยาวยอดที่เพิ่มขึ้นในวันที่ 120 = ความยาวยอดในวันที่ 120 – ความยาวเริ่มต้น

เปอร์เซ็นต์ความยาวยอดที่เพิ่มขึ้นในวันที่ 120 เทียบกับชุดควบคุม

$$= \frac{\text{ความยาวยอดที่เพิ่มขึ้นในวันที่ 120}}{\text{ความยาวยอดเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นในวันที่ 120 ของชุดควบคุม}} \times 100$$

3. สถานที่ทำการศึกษา

ห้องปฏิบัติการสาขาชีววิทยาประยุกต์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี จังหวัดลพบุรี

4. ระยะเวลาในการศึกษา

เดือนธันวาคม 2550 – พฤศจิกายน 2551