

## บทที่ 3

# วิธีดำเนินการวิจัย

### 3.1 เครื่องมือและวิธีการ

3.1.1 อุปกรณ์ถาวร ได้แก่ ตู้ laminar flow เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง สำหรับ ชั่งสารเคมี เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) เตาแก๊ส เตาไฟฟ้า หรือ ตู้ไมโครเวฟ

3.1.2 อุปกรณ์ เครื่องมือที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและย้ายชิ้นส่วนพืช ได้แก่ ปากคีบ ตะเกียง แอลกอฮอล์ กระดาษ A4 แผ่นแก้ว กรวย และกระบอกตวง

3.1.3 ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่สามารถควบคุมอุณหภูมิ  $25\pm 3$  องศาเซลเซียส ให้แสงจากหลอด cool white 14 ชั่วโมง/วัน ชั้นสำหรับวางขวดเนื้อเยื่อ

3.1.4 ต้นบัวอุบลชาติพันธุ์โคเร็คเตอร์จีทีมีวัวร์

3.1.5 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร MS (Murashige&Skoog, 1962)

3.1.6 สารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่

-BA (6-benzyladenine)

-2iP ( $N_6$ -isopentenyladenine)

-IAA (indole-3-acetic acid)

-NAA ( $\infty$ -naphthalene acetic acid)

-TDZ (Thidiazuron)

3.1.7 เครื่องแก้วชนิดต่างๆสำหรับเตรียมอาหารและบรรจุอาหาร ได้แก่ บีกเกอร์ ปิเปต ขวด เลี้ยงเนื้อเยื่อพร้อมฝาปิด ขวดDuran ขนาด 500 ml. พร้อมฝาปิด

3.1.8 อุปกรณ์ในการปลูกบัว เช่น ทราย ดิน ปุ๋ย

3.1.9 อุปกรณ์สำหรับการบันทึกผล ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ กล้องถ่ายภาพ

### 3.2 สถานที่ดำเนินงาน

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบัน เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

### 3.3 ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

ทำการทดลองระหว่าง มกราคม 2549 – กรกฎาคม 2550

### 3.4 วิธีการดำเนินงาน

แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง ดังนี้

3.4.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA และ 2iP ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดของบัวอบลชาติ

นำเหง้าของบัวอบลชาติมาล้างทำความสะอาด ตัดก้านใบ ดอก ราก ที่มีสิ่งสกปรกออก จากนั้นนำไปผ่านน้ำไหลเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วย ethanol 70% นาน 1 นาที ตามด้วย clorox 30% + tween20 2-3 หยด นาน 15 นาที แล้วตามด้วย mercuric chloride 2% + tween20 2-3 หยด นาน 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆละ 5 นาที (นภาวรณ ผลมณี. 2548) แล้วนำชิ้นส่วนที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว มาเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตระดับต่างๆ ตาม treatment combinations ที่กำหนด และเก็บไว้ในที่มีแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน วางแผนการทดลองแบบ factorial in completely randomized design มี 16 treatment combinations จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ชิ้นส่วน มี 2 ปัจจัย ดังนี้

ปัจจัย A คือความเข้มข้นของ IAA มี 4 ระดับ คือ

$$a1 = 0 \quad \mu\text{M}$$

$$a2 = 3 \quad \mu\text{M}$$

$$a3 = 6 \quad \mu\text{M}$$

$$a4 = 9 \quad \mu\text{M}$$

ปัจจัย B คือความเข้มข้นของ 2iP มี 4 ระดับ คือ

$$b1 = 0 \quad \mu\text{M}$$

$$b2 = 5 \quad \mu\text{M}$$

$$b3 = 10 \quad \mu\text{M}$$

$$b4 = 15 \quad \mu\text{M}$$

3.4.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดของบัวอบลชาติ

นำเหง้าของบัวอบลชาติมาล้างทำความสะอาด ตัดก้านใบ ดอก ราก ที่มีสิ่งสกปรกออก จากนั้นนำไปผ่านน้ำไหลเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วย ethanol 70% นาน 1 นาที ตามด้วย clorox 30% + tween20 2-3 หยด นาน 15 นาที แล้วตามด้วย mercuric chloride 2% + tween20 2-3 หยด นาน 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆละ 5 นาที (นภาวรณ ผลมณี. 2548) แล้วนำชิ้นส่วนที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว มาเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตระดับต่างๆ ตาม treatment combinations และเก็บไว้ในที่มีแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน วางแผนการทดลองแบบ factorial in completely randomized design มี 16 treatment combinations จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ชิ้นส่วน มี 2 ปัจจัย ดังนี้

ปัจจัย A คือความเข้มข้นของ NAA มี 4 ระดับ คือ

$$a1 = 0 \text{ } \mu\text{M}$$

$$a2 = 0.25 \text{ } \mu\text{M}$$

$$a3 = 0.5 \text{ } \mu\text{M}$$

$$a4 = 1 \text{ } \mu\text{M}$$

ปัจจัย B คือความเข้มข้นของ BA มี 4 ระดับ คือ

$$b1 = 0 \text{ } \mu\text{M}$$

$$b2 = 2 \text{ } \mu\text{M}$$

$$b3 = 4 \text{ } \mu\text{M}$$

$$b4 = 10 \text{ } \mu\text{M}$$

3.4.3 การทดลองที่ 3 ศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณบัวอบลชาติ

ใช้ยอดบัวอบลชาติจากสภาพปลอดเชื้อ มาเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตระดับต่างๆตาม treatment combinations และเก็บไว้ในที่มีแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design มี 4 treatments จำนวน 4 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ชั้นส่วน ดังนี้

treatment ที่ 1	IAA ความเข้มข้น 3 $\mu\text{M}$ ร่วมกับ 2iP ความเข้มข้น 15 $\mu\text{M}$ (วิธีการที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 3.4.1)
treatment ที่ 2	NAA ความเข้มข้น 0.5 $\mu\text{M}$ ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2 $\mu\text{M}$ (วิธีการที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 3.4.2)
treatment ที่ 3	NAA ความเข้มข้น 15 $\mu\text{M}$ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.005 $\mu\text{M}$ (กุลวรา จารุพันธุ์ และจันทิมา วรสัมปยุต. 2544)
treatment ที่ 4	NAA ความเข้มข้น 8 $\mu\text{M}$ ร่วมกับ 2iP ความเข้มข้น 32 $\mu\text{M}$ ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 11 $\mu\text{M}$ (Lakshmanan, 1994)

### 3.5 การบันทึกผล

3.5.1 เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด

3.5.2 ลักษณะการเจริญเติบโต

3.5.3 จำนวนยอด

3.5.4 จำนวนใบ

3.5.5 ขนาดของใบ

3.5.6 ความยาวก้านใบ

3.5.7 จำนวนราก

3.5.8 ความยาวราก

### **3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล**

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%