บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์ สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.1 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (Laminar air flow cabinet) (ตู้ประกอบของบริษัทเวชวิชย์)
1.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง (balance)(Mettler, PG203-S)
1.3 เครื่องวัดความเป็นกรด–ด่าง (pH meter) (Metrohm, 827 pH Lab)
1.4 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) (Hirayama, HVE-50)
1.5 เตาไฟฟ้า (Hot plate) (Schott, SLK2)
1.6 ตู้เย็น (Refrigerator) (Asia Intercool)
1.7 ตู้ควบคุมการเจริญเติบโต (Growth chamber) (Contherm, 99584)
1.8 กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (Nikon SMZ 1000)
1.9 ขวดแก้วขนาด 8 ออนซ์ พร้อมฝา
1.10 ชั้นวางขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
1.11 แผ่นพลาสติกรองตัดชิ้นเนื้อเยื่อ
1.12 ตะเกียงแอลกอฮอล์
1.13 ปากคีบและมีดผ่าตัด พร้อมใบมีดเบอร์ 11
1.14 ปิเปต 0.1, 1.0, 5.0 และ 10.0 มิลลิลิตร
1.15 บีกเกอร์ ขนาด 100, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
1.16 ขวดปรับปริมาตรขนาด 100, 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
1.17 กระบอกตวงขนาด 10, 25, 50 และ 100 มิลลิลิตร
1.18 ช้อนตักสาร
1.19 ถุงร้อน

2. สารเคมี

2.1 สารทดสอบความมีชีวิตของเมล็ด

1) 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (Merck, Germany)

2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต

1) N_6-Benzyladenine (BA) (Fluka Riedel-deHen, USA.)

2) Napthaleneacetic acid (NAA) (Fluka Riedel-deHen, USA.)

3) Thidiazurone (TDZ) (Fluka Riedel-deHen, USA.)

2.3 สารที่ใช้ปรับ pH

1) HCI 1.0 M (Merck, Germany)

2) NaOH 1.0 M (Ajax Finechem, Australia)

2.4 สารฟอกฆ่าเชื้อ

1) สารฆ่าและป้องกันกำจัดโรคพืช คาเบ็นดาซิม 50 0.2% (เทพสยามจำกัด ประเทศไทย)

2) แอลกอฮอล์ 70 และ 95% (Unionscience, Thailand)

3) Colox 5, 10 และ 15% (Unionscience, Thailand)

4) เมอร์คิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$) (Unionscience, Thailand)

2.5 สารจับใบ

1) Tween 20 (Unionscience, Thailand)

2.6 สารเคมีสำหรับการเตรียมสารละลายเข้มข้นอาหารสูตร MS (1962) เพื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (รายละเอียดในภาคผนวก ก)

3. พืชทดลอง

3.1 หญ้าหวาน (*Stevia rebaudiana* Bertoni.) จากอำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่

3.2 เมล็ดหญ้าหวาน จากอำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่

สถานที่ดำเนินการ

1. ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ศูนย์วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

2. ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

3. ห้องปฏิบัติการปรับปรุงพันธุ์พืช ภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

4. บริเวณพื้นที่ หมู่บ้านหวาย ตำบลมะกอก อำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูน

วิธีดำเนินการวิจัย

1. วิธีการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.1 สูตรอาหาร MS เพื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (รายละเอียดในภาคผนวก ข)

1.2 วิธีการเตรียมสารละลายเข้มข้นอาหารสูตร MS (1962) เพื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (รายละเอียดในภาคผนวก ค)

1.3 วิธีการเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต (รายละเอียดในภาคผนวก ง)

1.4 วิธีการเตรียมอาหารสูตร MS เพื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อและเมล็ดหญ้าหวาน (รายละเอียดในภาคผนวก จ)

2. วิธีการฆ่าเชื้อวัสดุอุปกรณ์

2.1 วิธีนึ่งฆ่าเชื้อ

ใช้กระดาษห่ออุปกรณ์ต่าง ๆ ได้แก่ ปากคีบ มีดผ่าตัด แผ่นพลาสติกรองตัดเนื้อเยื่อ จานแก้วเพาะเชื้อ ผ้าขาวบาง นำอุปกรณ์ต่างๆ เหล่านี้และขวดน้ำกลั่นไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที และเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ก่อนนำเข้าตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ

2.2 วิธีการฆ่าเชื้อโดยใช้เอธิลแอลกอฮอล์

2.2.1 เช็ดภายในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์แล้วเปิดหลอดอัลตราไวโอเลต (UV) ทิ้งไว้อย่างน้อย 30 นาที ก่อนลงมือปฏิบัติการ และเช็ดตู้ด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ขณะปฏิบัติการ และหลังปฏิบัติการ

2.2.2 เช็ดมือ และแขนด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ทั้งก่อน และขณะปฏิบัติการ ขณะปฏิบัติการทำการฆ่าเชื้อที่ปากคีบ และมีดผ่าตัดหลังการใช้เนื้อเยื่อแต่ละครั้ง ด้วยการจุ่มในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปผ่านเปลวไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์

3. การศึกษาการขยายพันธุ์หญ้าหวานโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.1 การทดลองที่ 1 การทดสอบความมีชีวิตเมล็ดหญ้าหวานด้วยวิธี Tetrazolium Test (TZ Test)

3.1.1 นำเมล็ดหญ้าหวานสีน้ำตาลและสีดำ มาอย่างละ 50 เมล็ด แยกแช่เมล็ดแต่ละสีในน้ำสะอาดที่อุณหภูมิห้อง ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

3.1.2 เตรียมสารละลายเทตระโซเลียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์โดยการชั่ง 2,3,-5 Triphenyltetrazolium chloride 1 กรัม ลงในน้ำกลั่น ปรับให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตรเก็บไว้ในขวดที่ป้องกันแสงได้

3.1.3 ใช้มีดผ่าตัดลอกเปลือกเมล็ดออก แยกเมล็ดที่ได้จากเมล็ดเปลือกสีน้ำตาลและเปลือกสีดำออกจากกัน ในระหว่างที่ผ่าเมล็ดให้ครบตามที่กำหนด ต้องคอยรักษาความชื้นให้แก่ต้นอ่อนที่ผ่าแล้วและเมล็ดที่ยังไม่ได้ผ่า โดยการแช่ในน้ำตลอดเวลาเพื่อรอการแช่ในสารละลายเทตระโซเลียมคลอไรด์ พร้อมกัน

3.1.4 บันทึกจำนวนเมล็ดสมบูรณ์และเมล็ดลีบฝ่อที่ได้จากเมล็ดสีน้ำตาลและสีดำ

3.1.5 นำเมล็ดที่ได้จากเมล็ดเปลือกสีน้ำตาลและเปลือกสีดำมาแยกแช่ในจานเพาะเชื้อที่มีสารละลายเทตระโซเลียมคลอไรด์ ตั้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 3 ชั่วโมงเมื่อครบเวลาที่แช่ รีบเทสารละลายเทตระโซเลียมคลอไรด์ออกจากเมล็ด แล้วนำไปล้างด้วยน้ำสะอาด 1-2 ครั้ง แล้วแช่เมล็ดไว้ในน้ำ

3.1.6 บันทึกจำนวนเมล็ดที่เมล็ดติดสีชมพูหรือแดงและเมล็ดที่ไม่ติดสี และประเมินความมีชีวิตของเมล็ด

3.1.7 ทำซ้ำตั้งแต่ ข้อ 3.1.1-ข้อ 3.1.6 อีก 2 ครั้ง

3.1.8 วิเคราะห์หาข้อมูล ดังนี้

1) จำนวนเมล็ดหญ้าหวานที่สมบูรณ์ และเมล็ดลีบฝ่อที่ได้จากเมล็ดสีน้ำตาลและเมล็ดสีดำใช้ในการทดลอง (เปอร์เซ็นต์)

2) จำนวนเมล็ดหญ้าหวานที่มีชีวิต และเมล็ดที่ไม่มีชีวิตจากเมล็ดสีน้ำตาลและเมล็ดสีดำที่ใช้ในการทดลอง (เปอร์เซ็นต์)

3.2 การทดลองที่ 2 การศึกษาการใช้สารฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเนื้อเยื่อและเมล็ดหญ้าหวาน

3.2.1 การศึกษาการใช้สารและวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อชิ้นส่วนข้อหญ้าหวาน

1) ตัดต้นหญ้าหวานให้มีความยาวจากยอดลงมาประมาณ 5 เซนติเมตร นำมาลิดใบออก

2) ล้างด้วยน้ำไหลเพื่อล้างเศษดินออกเป็นเวลา 30 นาที

3) ตัดส่วนข้อออกเป็นท่อนๆ ให้มีความยาวประมาณ 2 เซนติเมตรล้างด้วยน้ำยาล้างจานประมาณ 1 นาที แช่เนื้อเยื่อในน้ำยาฆ่าเชื้อราคาเบ็นดาซิม ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำเนื้อเยื่อที่ได้มาฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 7 วิธี คือ

วิธีที่ 1 ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ผสมทวีน 20 จำนวน 2 หยด เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

วิธีที่ 2 ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ผสม ทวีน 20 จำนวน 2 หยด เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

วิธีที่ 3 ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ผสมทวีน 20 จำนวน 2 หยด เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

วิธีที่ 4 ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ผสมทวีน 20 จำนวน 2 หยด เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

วิธีที่ 5 ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ผสมทวีน 20 จำนวน 2 หยด เป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ด้วย สารละลายคลอร็อกซ์ ความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ผสมทวีน 20 จำนวน 2 หยด เป็นเวลา 5, 5 นาที ตามลำดับ ล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

วิธีที่ 6 จุ่มแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ผสมทวีน 20 จำนวน 2 หยด เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

วิธีที่ 7 ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ผสมทวีน 20 จำนวน 2 หยด ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

4) นำชิ้นเนื้อเยื่อหญ้าหวานที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาตัดแต่งชิ้นส่วนข้อให้มีขนาด 1.5 เซนติเมตร

5) นำชิ้นส่วนข้อไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 30 ซ้ำต่อวิธี

6) นำไปเลี้ยงในตู้ควบคุมการเจริญเติบโต ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

7) บันทึกเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนและการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อทุก ๆ สัปดาห์

8) เลือกใช้สารและวิธีการที่เหมาะสมเพื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อหญ้าหวานให้ได้ยอดอ่อนจำนวนมากสำหรับย้ายเลี้ยงต่อไป

3.2.2 การศึกษาการใช้สารและวิธีการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดหญ้าหวานที่เหมาะสม

1) นำเมล็ดหญ้าหวานที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตมาก จำนวน 300 เมล็ด ล้างด้วยน้ำไหล เป็นเวลา 30 นาที

2) ล้างด้วยน้ำยาล้างจานประมาณ 1 นาที แช่เมล็ด จำนวน 100 เมล็ด ในน้ำยาฆ่าเชื้อราคาเบ็นดาซิม ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที กรองเมล็ดด้วยผ้าขาวบางที่สะอาด แล้วนำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 7 วิธี ดังนี้

วิธีที่ 1 นำเมล็ดไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ผสม ทวีน 20 จำนวน 2 หยด เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้ง กรองเมล็ดด้วยผ้าขาวบางที่สะอาด และฆ่าเชื้อแล้ว

วิธีที่ 2 นำเมล็ดไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ผสม ทวีน 20 จำนวน 2 หยด เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้ง กรองเมล็ดด้วยผ้าขาวบางที่สะอาด และฆ่าเชื้อแล้ว

วิธีที่ 3 นำเมล็ดไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ผสม ทวีน 20 จำนวน 2 หยด เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้ง กรองเมล็ดด้วยผ้าขาวบางที่สะอาด และฆ่าเชื้อแล้ว

วิธีที่ 4 นำเมล็ดไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ผสม ทวีน 20 จำนวน 2 หยด เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้ง กรองเมล็ดด้วยผ้าขาวบางที่สะอาด และฆ่าเชื้อแล้ว

วิธีที่ 5 นำเมล็ดไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ผสม ทวีน 20 จำนวน 2 หยด เป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ด้วย สารละลายคลอร็อกซ์ ความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ผสมทวีน 20 จำนวน 2 หยด เป็นเวลา 5, 5 นาที ตามลำดับ ล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้ง กรองเมล็ดด้วยผ้าขาวบางที่สะอาด และฆ่าเชื้อแล้ว

วิธีที่ 6 นำเมล็ดจุ่มในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที กรองเมล็ดด้วยผ้าขาวบางที่สะอาด ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ผสม ทวีน 20 จำนวน 2 หยด เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งโดยแต่ละครั้ง กรองเมล็ดด้วยผ้าขาวบางที่สะอาด และฆ่าเชื้อแล้ว

วิธีที่ 7 นำเมล็ดฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ผสม ทวีน 20 จำนวน 2 หยด ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งกรองเมล็ดด้วยผ้าขาวบางที่สะอาด และฆ่าเชื้อแล้ว

3) นำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อเลี้ยงบนอาหาร MS (1962) ที่เติม BA ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 3 เมล็ดต่อขวด จำนวน 30 ซ้ำต่อวิธี

4) นำไปเลี้ยงในตู้ควบคุมการเจริญเติบโต ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

5) บันทึกเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน และการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อทุก ๆ สัปดาห์

6) เลือกวิธีการที่เหมาะสมเพื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อหญ้าหวานให้ได้ยอดอ่อนจำนวนมากสำหรับย้ายเลี้ยงต่อไป

3.2.3 การย้ายเลี้ยงหญ้าหวานเพื่อเตรียมทดลอง

1) นำต้นหญ้าหวานในสภาพปลอดเชื้อจากการทดลอง ข้อที่ 3.2.1 และ 3.2.2 ตัดส่วนข้อของต้นหญ้าหวาน นำมาตัดแต่งให้มีขนาด 1.5 เซนติเมตรและย้ายเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

2) เพาะเลี้ยงในตู้ควบคุมการเจริญเติบโต ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสง เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อให้ได้ยอดอ่อนจำนวนมาก

3) ทำการแยกยอดอ่อนของหญ้าหวานเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS (1962) ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต นำไปเพาะเลี้ยงในตู้ควบคุมการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จะได้ต้นหญ้าหวานที่ปลอดเชื้อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.3 การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ร่วมกับ NAA ต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวาน

3.3.1 เลือกต้นหญ้าหวานในสภาพปลอดเชื้อจาก ข้อ 3.2.3 ที่มีความสูงประมาณ 4-6 เซนติเมตร ตัดแต่งส่วนข้อให้มีขนาด 1.5 เซนติเมตร

3.3.2 ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนข้อของหญ้าหวาน บนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีความเข้มข้นที่ต่างกันของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร รวม 16 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 15 ซ้ำ ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 อัตราส่วนความเข้มข้นของ TDZ และ NAA ในสูตรอาหารที่เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อหญ้าหวาน

ชุดการทดลอง	ความเข้มข้นของ TDZ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของ NAA (มิลลิกรัมต่อลิตร)
1	0	0
2	0.1	0
3	0.3	0
4	0.5	0
5	0	1
6	0.1	1
7	0.3	1
8	0.5	1
9	0	3
10	0.1	3
11	0.3	3
12	0.5	3
13	0	5
14	0.1	5
15	0.3	5
16	0.5	5

3.3.3 นำชุดการทดลองทั้งหมดไปไว้ในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์

3.3.4 สังเกตและบันทึก จำนวนยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ความยาวของยอด จำนวนรากต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ความยาวราก จำนวนแคลลัสต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ความยาวเส้นผ่าศูนย์กลางของแคลลัส โดยทำการวัด ดังนี้

1) ความยาวของยอด คือความยาวที่วัดตั้งแต่โคนต้นจนถึงปลายยอด

2) ความยาวของราก คือความยาวที่วัดตั้งแต่โคนรากจนถึงปลายราก

3) ความยาวเส้นผ่าศูนย์กลางของแคลลัส คือ ความยาวที่วัดตามแนวราบที่ยาวที่สุดจากบริเวณขอบด้านหนึ่งของก้อนแคลลัสไปยังขอบด้านตรงกันข้าม

โดยบันทึกผลทุกสัปดาห์เป็นเวลา 8 สัปดาห์

3.4 การทดลองที่ 4 การศึกษาการอยู่รอดของต้นอ่อนหญ้าหวานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมื่อย้ายออกปลูกในโรงเรือน

3.4.1 เตรียมดินผสม โดยใช้วัสดุปลูกต่างๆ คือ ดินผสมสำเร็จ หรือ ทรายผสมขี้เถ้าแกลบผสมขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1:1:1 ในถุงดำหรือกระถางเล็ก ๆ

3.4.2 นำต้นอ่อนที่ได้จากข้อ 3.3 การทดลองที่ 3 มาคลายเกลียวฝาขวดเป็นเวลา 1 วัน ก่อนเปิดฝาขวด

3.4.3 ทำการเปิดฝาขวด แล้วใช้ถุงพลาสติกใสหุ้ม ทิ้งไว้อีก 1 วัน

3.4.4 นำต้นอ่อนมาล้างเอาวุ้นออกจนหมด แช่ต้นอ่อนในน้ำยาฆ่าเชื้อราเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปปลูกในดินผสมที่เตรียมไว้ รดน้ำให้ชุ่ม ใช้ถุงพลาสติกใสคลุมไว้

3.4.5 นำไปไว้ในโรงเรือนที่มีแสงรำไร เป็นเวลา 2 วัน เปิดถุงพลาสติกที่คลุมและ รดน้ำทุกวัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์

3.4.6 สังเกตและบันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตทุก ๆ สัปดาห์

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

การทดลองทั้งหมดใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design (CRD) โดยผลการทดลองถูกแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one way ANOVA) จากนั้นทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05