บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ต้นไฮเดรนเยียสูง 2-3 เซนติเมตร ที่ได้จากการขยายพันธุ์ในสภาวะปลอดเชื้อ
2. กระถางดินเผาที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางปากประถาง 25 เซนติเมตร (10 นิ้ว) ลึก 30 เซนติเมตร (12 นิ้ว)
3. กระถางดินเผาที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางปากกระถาง 20 เซนติเมตร (8 นิ้ว) ลึก 25 เซนติเมตร (10 นิ้ว)
4. ถุงพลาสติกสีดำ ขนาด 7.5x17.5 เซนติเมตร (3x7 นิ้ว)
5. ตาข่ายสีดำ ที่เมื่อคลุมโรงเรือนแล้วจะลดแสงธรรมชาติลง 25,50 หรือ 75 เปอร์เซนต์
6. ห้องควบคุมอุณหภูมิ ขนาด กว้างxยาวxสูง 3x3x3 เมตร จำนวน 3 ห้อง ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิได้ตั้งแต่ 5-30 องศาเซลเซียส ที่ความแม่นยำ ± 1 องศาเซลเซียส
7. รถเข็น
8. ไม้บรรทัด
9. เวอร์เนียแคลิปเปอร์
10. ปุ๋ย
    - 10.1 ปุ๋ยที่ให้ทางใบ
        - 10.1.1 ปุ๋ยกาวิโอต้า (Gaviota) สูตร 18-18-18
        - 10.1.2 ปุ๋ยยูนิเลท (Unilate) ที่ประกอบด้วยธาตุอาหารรอง 8 ชนิด คือ Mg, Mn, Fe, Cu, Zn, Co, B และ Mo ในปริมาณ 2.4, 1.5, 1.5, 0.5, 0.5, 0.5, 0.3 และ 0.03 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

10.2 ปุ๋ยสำหรับผสมวัสดุปลูก

10.2.1 ปุ๋ยซูปเปอร์ฟอสเฟต

10.2.2 ปูนขาว

10.2.3 ปุ๋ยรองพื้นสูตรผสม 15-15-15

11. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

11.1 เครื่องตัดล้อหมุน (rotary microtome) ยี่ห้อ Leitz Wetzlar Type 1212

11.2 เครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer)

11.3 ตู้อบ (hot air oven)

11.4 กระจกสไลด์และกระจกปิดสไลด์

11.5 ขวดแก้ว

11.6 ขวดแก้วสำหรับย้อมสี (staining jar)

11.7 มีดผ่าตัด

11.8 กล้องจุลทรรศน์ และกล้องถ่ายภาพ

12. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

12.1 น้ำยาฆ่าเซลล์ และรักษาสภาพเซลล์ (killing and fixing solution) ได้แก่ เอฟ.เอ.เอ. (formalin acetic acid alcohol = FAA.) ประกอบด้วยส่วนผสมของ

- เอธิลแอลกอฮอล์ 50 หรือ 70 เปอร์เซนต์ จำนวน 90 มิลลิลิตร
- กรดกลาเซียลอซิติค จำนวน 5 มิลลิลิตร
- ฟอร์มาลีน จำนวน 5 มิลลิลิตร

12.2 น้ำยาสำหรับใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating reagent) ประกอบด้วยน้ำกลั่น เอธิลแอลกอฮอล์ 90 เปอร์เซนต์ เอธิลแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ และ ที.บี.เอ. (tertiary butyl alcohol = TBA.) โดยผสมไว้เป็นอัตราส่วนต่างๆ 5 ระดับคือ 50,70,85,95 และ 100 เปอร์เซนต์ (ตารางผนวกที่ 1 หน้า 75)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

12.3 พาราฟิน (paraffin) ใช้เป็นสารตัวกลางสำหรับฝังเนื้อเยื่อ (embedding media) แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ

12.3.1 พาราฟินสำหรับใช้เป็นตัวกลางในการแทรกซึมเข้าไปในช่องว่างของเนื้อเยื่อ (infiltration) ใช้ส่วนผสมของพาราฟินเหลว (paraffin oil) กับ ที.บี.เอ. อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร

12.3.2 พาราพลาสต์ (paraplast) สำหรับใช้ฝังเนื้อเยื่อ (embedding)

12.4 น้ำยาอัลบูมิน (albumin) สำหรับใช้ยึดเนื้อเยื่อพืชให้ติดกับแผ่นสไลด์

12.5 น้ำยาไซลีน (xylene) สำหรับทำให้เนื้อเยื่อใสสะอาด (clearing reagent)

12.6 สีดาลาฟิลด์ฮีมาทอกซิลิน (dalafield's hematoxylin) สำหรับใช้ย้อมเนื้อเยื่อ

12.7 สารตัวกลางแคนาดาบาลซัม (canada balsum) สำหรับใช้ปิดแผ่นสไลด์

วิธีการวิจัย

1. การทดลองที่ 1 การศึกษาอิทธิพลของความเข้มแสงที่มีต่อการเจริญและการออกดอกของไฮเดรนเยีย

1.1 การเตรียมต้นพืชทดลอง

นำต้นอ่อนไฮเดรนเยียสูง 2-3 เซนติเมตร ที่ได้จากการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาวะปลอดเชื้อ (in vitro) ย้ายออกจากขวด ลงปลูกในกะบะทรายละเอียด ที่มีขนาดกว้าง 25 ยาว 30 และลึก 7.5 เซนติเมตร เลี้ยงต้นอ่อนของไฮเดรนเยียนี้ไว้ในโรงเรือนหลังคาโปร่งแสง เมื่อต้นอ่อนอายุได้ 4 สัปดาห์ ขนาดต้นมีความสูงประมาณ 5 เซนติเมตร และแข็งแรงดีจึงย้ายปลูกครั้งที่ 2 ลงในถุงพลาสติกสีดำขนาด 7.5x17.5 เซนติเมตร โดยใช้วัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของดินดำ ทราย ขุยมะพร้าว และปุ๋ยคอก ในอัตราส่วน 1:1:1:1 โดยปริมาตร และเติมปุ๋ยซุปเปอร์ฟอสเฟตจำนวน 1,000 กรัม ปูนขาวจำนวน 500

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรัม และปุ๋ยสูตรผสม 15-15-15 จำนวน 1,000 กรัม คลุกเคล้ากับวัสดุปลูก 1 ลูกบาศก์เมตร เมื่อปลูกไฮเดรนเยียได้ 6 เดือน จึงย้ายปลูกครั้งที่ 3 ลงในกระถางดินเผาที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 25 เซนติเมตร ลึก 30 เซนติเมตร แล้วใช้ต้นที่เพิ่งย้ายปลูกครั้งที่ 3 นี้เป็นพืชทดลองในการทดลองที่ 1 ต่อไป

1.2 **แผนการทดลอง**

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) แบ่งการทดลองออกเป็น 4 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีใช้ต้นไฮเดรนเยีย 20 ต้น ปลูกเลี้ยงต้นไฮเดรนเยียในโรงเรือนที่คลุมด้วยตาข่ายสีดำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 หลังจากการย้ายปลูกครั้งที่ 2 และที่ 3 แล้ว ปลูกเลี้ยงไฮเดรนเยียไว้ในโรงเรือนที่คลุมด้วยตาข่ายสีดำ เพื่อลดแสงลง 25 เปอร์เซนต์

กรรมวิธีที่ 2 หลังจากการย้ายปลูกครั้งที่ 2 และที่ 3 แล้ว ปลูกเลี้ยงไฮเดรนเยียไว้ในโรงเรือนที่คลุมด้วยตาข่ายสีดำ เพื่อลดแสงลง 50 เปอร์เซนต์

กรรมวิธีที่ 3 หลังจากการย้ายปลูกครั้งที่ 2 และที่ 3 แล้ว ปลูกเลี้ยงไฮเดรนเยียไว้ในโรงเรือนที่คลุมด้วยตาข่ายสีดำ เพื่อลดแสงลง 75 เปอร์เซนต์

กรรมวิธีที่ 4 หลังจากการย้ายปลูกครั้งที่ 2 แล้วปลูกเลี้ยงต้นไฮเดรนเยียไว้ในโรงเรือนที่คลุมด้วยตาข่ายสีดำ เพื่อลดแสงลง 75 เปอร์เซนต์ และหลังจากการย้ายปลูกครั้งที่ 3 จึงย้ายไปปลูกในโรงเรือนที่คลุมด้วยตาข่ายสีดำ เพื่อลดแสงลง 50 เปอร์เซนต์

1.3 การปลูกเลี้ยง การให้น้ำและให้ปุ๋ย

1.3.1 การปลูกเลี้ยงหลังจากย้ายปลูกครั้งที่ 2 ได้เลี้ยงต้นไฮเดรนเยียในโรงเรือนทดลองโดยใช้ระยะห่าง 20x20 เซนติเมตร ตั้งแต่เดือนมิถุนายนถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ.2532

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3.2 การปลูกเลี้ยงหลังจากย้ายปลูกครั้งที่ 3 ได้เลี้ยงต้นไฮเดรนเยียในโรงเรือนทดลอง โดยใช้ระยะห่าง 40x40 เซนติเมตร

1.3.3 การให้น้ำ ให้น้ำต้นไฮเดรนเยียทุกวันด้วยน้ำประปา วันละ 2 ครั้ง

1.3.4 การให้ปุ๋ยทางใบ

1.3.4.1 ให้ปุ๋ยสูตร 18-18-18 ละลายน้ำในอัตรา 1 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร พ่น 2 ครั้งต่อสัปดาห์

1.3.4.2 ให้ปุ๋ยยูนิเลท ละลายน้ำในอัตรา 0.5 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร พ่นทุก 15 วัน

1.4 การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลของพืชทดลอง ดังต่อไปนี้

1.4.1 ความสูงของต้นจากผิวดิน

1.4.2 จำนวนข้อ

1.4.3 จำนวนใบที่คลี่เต็มที่แล้ว

1.4.4 เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น บริเวณที่อยู่สูงจากผิวดินขึ้นไป 10 เซนติเมตร

1.4.5 เส้นผ่าศูนย์กลางของช่อดอก บริเวณที่กว้างที่สุด

1.4.6 เส้นผ่าศูนย์กลางของดอกย่อย บริเวณที่กว้างที่สุด

1.4.7 จำนวนดอกย่อยต่อช่อ

1.4.8 จำนวนวันหลังจากย้ายปลูกครั้งที่ 3 จนดอกบาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การทดลองที่ 2 การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิกลางคืนที่มีต่อการเจริญและการออกดอกของไฮเดรนเยีย

2.1 การเตรียมต้นพืชทดลอง

เตรียมต้นไฮเดรนเยียในลักษณะเดียวกันกับการทดลองที่ 1 แต่การย้ายปลูกครั้งที่ 2 ได้ปลูกลงในกระถางดินเผาที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร โดยตรง แล้วเลี้ยงต้นในโรงเรือนที่คลุมด้วยตาข่ายสีดำเพื่อลดแสงลง 50 เปอร์เซนต์หลังจากนั้น 4 สัปดาห์จึงเด็ดยอดแล้วปล่อยให้ตาข้างเจริญขึ้นมาใหม่จำนวน 3 ยอดต่อกระถาง ยอดที่เป็นส่วนเกินได้เด็ดออกทุกๆ สัปดาห์ เลี้ยงต้นไฮเดรนเยียต่อไปอีก 8 สัปดาห์ จึงใช้ต้นไฮเดรนเยียเหล่านี้เป็นพืชทดลองสำหรับสุ่มนำไปใช้ในการทดลองที่ 2

2.2 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยจัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียลมี 9 กรรมวิธี ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัยที่ 1 อุณหภูมิกลางคืนมี 3 ระดับ คือ 12, 16 และ 20 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการปลูกเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์ ส่วนเวลากลางวันตั้งแต่ 08.00-16.00 นาฬิกา นำต้นไฮเดรนเยียปลูกเลี้ยงในสภาพธรรมชาติ ในโรงเรือนที่คลุมด้วยตาข่ายสีดำ เพื่อลดแสงลง 50 เปอร์เซนต์

ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาที่ใช้ปลูกเลี้ยงไฮเดรนเยียในห้องเย็น ที่ควบคุมอุณหภูมิกลางคืนและกลางวัน 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานต่างกัน 3 ระดับคือ 2, 3 และ 4 สัปดาห์ โดยให้ได้รับความมืดตลอดเวลา

ดังนั้นในการทดลองที่ 2 จึงมีการทดลอง 9 กรรมวิธี (ตารางที่ 1) แต่ละกรรมวิธีใช้พืชทดลอง 10 กระถาง กระถางละ 1 ต้น เด็ดยอดแล้วปล่อยให้แตกยอดใหม่ต้นละ 3 กิ่ง โดยปลูกจนกระทั่งดอกบาน 5 กระถาง (บันทึกข้อมูลโดยการสุ่มกระถางละ 1 กิ่ง) และแบ่งศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาอีก 5 กระถาง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 แสดงกรรมวิธีในการทดลองที่ 2

อุณภูมิกลางคืน นาน 8 สัปดาห์ (3 ระดับ)	ระยะเวลาที่ให้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส		
	2 สัปดาห์	3 สัปดาห์	4 สัปดาห์
12 องศาเซลเซียส	กรรมวิธีที่ 1	กรรมวิธีที่ 2	กรรมวิธีที่ 3
16 องศาเซลเซียส	กรรมวิธีที่ 4	กรรมวิธีที่ 5	กรรมวิธีที่ 6
20 องศาเซลเซียส	กรรมวิธีที่ 7	กรรมวิธีที่ 8	กรรมวิธีที่ 9

2.3 การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา (Histology)

ทำการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของตาใบและตาดอก โดยการสุ่มตัวอย่างจากปลายยอดของพืชทดลองจากแต่ละกรรมวิธีในระยะต่างๆกันคือ หลังจากได้ทำการทดลองไปแล้ว 8,10,12 และ 14 สัปดาห์ และสุ่มมาครั้งละ 4 ยอดต่อกรรมวิธี นำมาศึกษาตามวิธีการ paraffin embedding technique ของ Johansen (1940) ตามขั้นตอนดังนี้

2.3.1 ตัดชิ้นส่วนปลายยอดพืชทดลอง

2.3.2 ฆ่าเซลล์และรักษาสภาพเซลล์ด้วยน้ำยา เอฟ.เอ.เอ

2.3.3 ดึงน้ำออกจากเซลล์โดยใช้น้ำยาที่มีระดับของแอลกอฮอล์ที่เข้มข้นต่ำ 50 เปอร์เซนต์ ก่อนแล้วเพิ่มความเข้มข้นเป็น 70,85,95 และ 100 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.4 ทำให้พาราฟินแทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อพืช โดยใช้ส่วนผสมของที.บี.เอ กับพาราฟินเหลว อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง

2.3.5 จากข้อ 2.3.4 นำมาเทรวมกับพาราพลาสต์ ที่หลอมไว้ล่วงหน้าแล้ว ให้มีอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร นำไปอบในตู้อบ ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 56-58 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.3.6 เปลี่ยนมาใช้พาราพลาสต์ที่หลอมไว้ล่วงหน้า เก็บไว้ในตู้อบเป็นเวลา 1 สัปดาห์

2.3.7 ฝังชิ้นส่วนของพืชลงในพาราพลาสต์ แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น

2.3.8 นำชิ้นส่วนของพืชที่ฝังในพาราพลาสต์เรียบร้อยแล้ว มาตัดด้วยเครื่องตัดล้อหมุนให้มีความหนา 10 ไมครอน

2.3.9 นำแผ่นเนื้อเยื่อที่ตัดได้ติดบนกระจกสไลด์ด้วยอัลบูมิน แล้วนำสไลด์ไปอุ่นบนเครื่องอุ่นสไลด์ เพื่อให้เซลล์เนื้อเยื่อตึง

2.3.10 อบสไลด์ในตู้อบอุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสไลด์ไปย้อมด้วยสีตาลาฟิลด์ฮีมาทอกซิลิน และปิดแผ่นสไลด์ โดยใช้แคนาดาบาลซั่มเป็นตัวยึด

2.3.11 นำสไลด์ถาวรที่ได้ไปศึกษาระยะการพัฒนาของตาดอก ในเวลาต่างๆกัน และบันทึกภาพไว้

2.4 การปลูกเลี้ยง การให้น้ำ และให้ปุ๋ย

2.4.1 หลังจากย้ายปลูกครั้งที่ 2 แล้ว ได้เลี้ยงต้นพืชทดลองในโรงเรือนทดลองที่คลุมด้วยตาข่ายสีดำเพื่อลดแสง 50 เปอร์เซนต์ โดยวางกระถางให้มีระยะห่างระหว่างต้นและระหว่างแถวเท่ากับ 30x30 เซนติเมตร

2.4.2 การเลี้ยงต้นพืชทดลองในห้องเย็นที่ควบคุมอุณหภูมิกลางคืน โดยใช้ระยะห่างระหว่างต้นและระหว่างแถวเท่ากับ 40x40 เซนติเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.3 การให้น้ำและให้ปุ๋ยพืชทดลอง ใช้วิธีการเดียวกับการทดลองที่ 1

2.5 การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลของพืชทดลองดังต่อไปนี้

2.5.1 ความสูงของกิ่งจากจุดที่เชื่อมกับลำต้นหลักถึงตำแหน่งข้อใบคู่สุดท้าย ที่คลี่เต็มที่แล้ว

2.5.2 จำนวนข้อของกิ่ง

2.5.3 จำนวนใบ

2.5.4 เส้นผ่าศูนย์กลางของกิ่งบริเวณที่อยู่ห่างจากจุดที่กิ่งเชื่อมกับลำต้นหลัก ไป 10 เซนติเมตร

2.5.5 เส้นผ่าศูนย์กลางของช่อดอก บริเวณที่กว้างที่สุด

2.5.6 เส้นผ่าศูนย์กลางของดอกย่อย บริเวณที่กว้างที่สุด

2.5.7 จำนวนดอกย่อยต่อช่อ

2.5.8 จำนวนวันตั้งแต่เริ่มให้อุณหภูมิจนเริ่มมองเห็นตาดอกด้วยตาเปล่า

2.5.9 จำนวนวันตั้งแต่เริ่มมองเห็นตาดอก จนถึงดอกบานเต็มที่

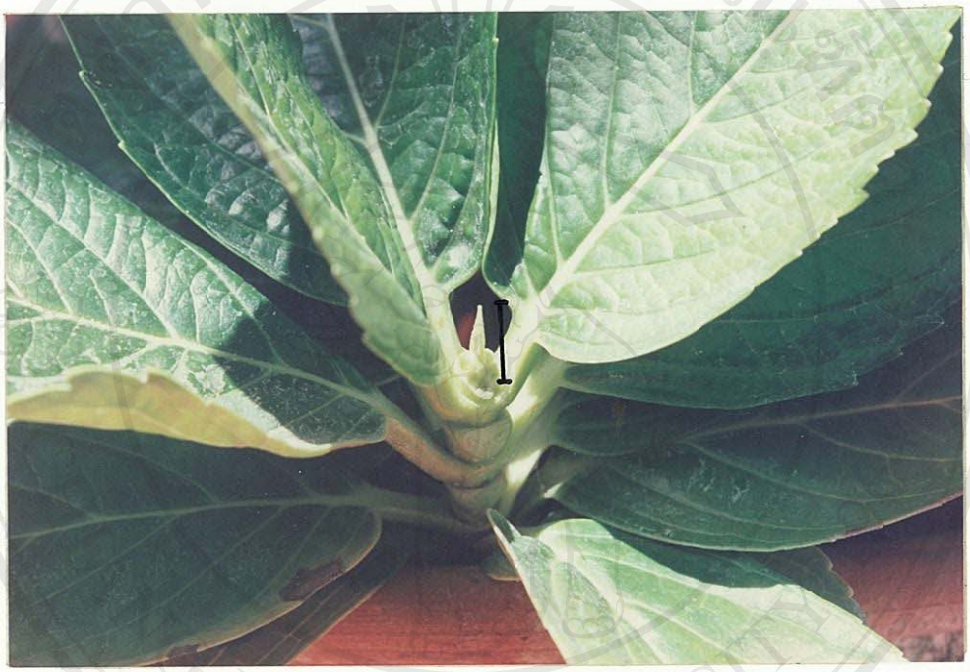
2.5.10 ระยะการพัฒนาของตายอด ตามระยะเวลาที่กำหนดไว้ในข้อ 2.3

3. สถานที่ทำการทดลอง

3.1 แปลงทดลอง และห้องปฏิบัติการของภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.2 แปลงทดลองของศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 6 แสดงตำแหน่งของตาดอกที่นำมาศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 7 แสดงลักษณะช่อดอกของไฮเดรนเยีย

A = ช่อดอกปกติ

B = ช่อดอกผิดปกติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved