บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 พืชทดลอง

หัวพันธุ์ว่านมหาลาภที่มีขนาดเส้นรอบวง 2-15 ซม และช่อดอกว่านมหาลาภที่มีระยะการพัฒนาของช่อดอกต่าง ๆ กัน จากแปลงปลูกว่านมหาลาภในสภาพธรรมชาติของศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.หางดง จ.เชียงใหม่

1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเนื้อเยื่อวิทยา

1.2.1 กล้องจุลทรรศน์สองตาแบบสเตอริโอ

1.2.2 กล้องจุลทรรศน์

1.2.3 มีดผ่าตัด

1.2.4 เข็มเขี่ย

1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการตัดชิ้นส่วนพืช เพื่อการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

1.3.1 เครื่องฝานเนื้อเยื่อ (rotary microtome) ของ Leitz wetzlar

1.3.2 ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 35 °ซ และ 56 °ซ

1.3.3 เครื่องอุ่นสไลด์ (hot plate)

1.3.4 แท่งไม้ขนาด 1.5 X 1.5 X 1.5 ลบ ซม ต้มให้อิ่มตัวในพาราฟิน

1.3.5 กระจกสไลด์ และกระจกปิดสไลด์ (ขนาด 22 X 22 มม)

1.3.6 ขวดแก้วสำหรับย้อมสี (staining jar)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.4 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมชิ้นส่วนพืชและสไลด์ถาวร

1.4.1 น้ำยาที่ใช้ในการฆ่าเซลล์และรักษาสภาพเซลล์ (killing and fixing solution) ได้แก่ F.A.A.(Formalin - Aceto - Alcohol) มีส่วนผสมของสารเคมีดังนี้ (Johansen, 1940)

50% ethyl alcohol	90%
glacial acetic acid	5%
formalin	5%

1.4.2 น้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution) ประกอบด้วย 95% ethyl alcohol absolute alcohol tertiary butyl alcohol (TBA) และน้ำกลั่น โดยผสมไว้เป็นอัตราส่วน 4 ระดับ ตามวิธีของ Sass (1966) ซึ่งมีส่วนผสมดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 อัตราส่วนของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์

grade	95% ethyl alcohol (มล)	absolute alcohol (มล)	TBA (มล)	น้ำกลั่น (มล)
70%	50	-	20	30
85%	50	-	35	15
95%	50	-	50	-
100%	-	25	75	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.4.3 สารตัวกลางที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อ ได้แก่ paraplast

1.4.4 น้ำยายึดเนื้อเยื่อให้ติดแผ่นสไลด์ (adhesive) ใช้ albumin

1.4.5 น้ำยาทำให้เนื้อเยื่อใสสะอาด (clearing reagent) คือ xylol

1.4.6 สีย้อมเนื้อเยื่อ ใช้สี Dalafield's haematoxylin ซึ่งมีส่วนผสมดังนี้ (Johansen, 1940)

allumunium sulfate	400	มก
haematoxylin	4	ก
95% ethyl alcohol	25	มก
methyl alcohol	100	มก
glycerol	100	มก

1.4.7 สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นสไลด์ คือ Canada balsam

1.5 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการศึกษาการปรับปรุงคุณภาพของช่อดอก

1.5.1 ห้องควบคุมอุณหภูมิ 2° 5° และ 10° ซ

1.5.2 เครื่องวัดอุณหภูมิและความชื้น

1.5.3 เครื่องชั่งชนิดละเอียด

1.5.4 ขวดแก้วใช้เป็นแจกันในการทดสอบอายุการใช้งานของช่อดอก

1.6 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาการปรับปรุงคุณภาพของช่อดอก

1.6.1 น้ำตาลทรายขาว

1.6.2 8-hydroxyquinoline sulfate (8-HQS)

1.6.3 silver nitrate ($AgNo_3$)

1.6.4 aluminium sulfate ($Al_2(SO_4)_3 \cdot 8\ H_2O$)

1.6.5 citric acid

1.6.6 benzoic acid

1.6.7 kinetin

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. วิธีการทดลอง

ทำการศึกษาโดยแยกออกเป็น 3 งานทดลองคือ

2.1 การศึกษาขนาดของหัวพันธุ์ที่สามารถให้ดอกได้

2.1.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

นำหัวว่านมหาลาภที่อยู่ในระยะพักตัวที่มีขนาดเส้นรอบวงตั้งแต่ 3-15 ซม จัดแบ่งเป็นกลุ่มตามขนาดของเส้นรอบวงคือ 3.1-5.0 5.1-7.0 7.1-9.0 9.1-11.0 11.1-13.0 และ 13.1-15.0 ซม ขนาดละ 10 หัว มาทำการแกะกาบใบ (scale) ที่ประกอบขึ้นเป็นหัวออกทีละชั้น ตรวจนับจำนวนชั้นของกาบใบจนถึงส่วนกลางของหัว เมื่อหมดชั้นของใบแล้วนำไปศึกษาใต้กล้องสองตาแบบสเตอริโอ ขนาดละ 5 หัว อีก 5 หัว นำไปศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา โดยวิธี paraffin embedding method (Johansen, 1940; Sass,1966) โดยตัดเอาส่วนของยอดไปตรึงในน้ำยา F.A.A แล้วทำการ dehydrate ด้วย tertiary butyl alcohol ตามลำดับของ grade แล้ว infiltrate ใน parafin oil และ paraplast ตามลำดับ หลังจากนั้นจึงนำไปทำการฝานเนื้อเยื่อ โดยใช้เครื่องฝานเนื้อเยื่อแบบมือหมุน และย้อมสีด้วยวิธี Dalafield's haematoxyline technique แล้วนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุดเจริญปลายยอดภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.1.2 การบันทึกผล

ทำการบันทึกข้อมูลต่าง ๆ ดังนี้

2.1.2.1 จำนวนชั้นของกาบใบต่อหัว

2.1.2.2 ลักษณะของยอดเป็นตาใบหรือช่อดอก

2.1.2.3 ความยาวของช่อดอก โดยวัดจากโคนถึงปลายของช่อดอก สำหรับหัวที่สร้างช่อดอกแล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 การศึกษาผลของการเก็บรักษาหัวพันธุ์ที่มีต่อการพัฒนาของช่อดอก

นำหัวว่านมหาลาภที่อยู่ในระยะพักตัว มาคัดขนาดตามขนาดของเส้นรอบวงของหัว โดยแบ่งเป็น 4 กลุ่ม คือ 7.1-9.0 9.1-11.0 11.1-13.0 และ 13.1-15.0 ซม แล้วนำหัวเหล่านั้นไปเก็บรักษาไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ระดับอุณหภูมิ 5 ° และ 10 °ซ เปรียบเทียบกับการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทุก ๆ สัปดาห์นำหัวพันธุ์ขนาดต่าง ๆ ที่เก็บรักษาไว้ในทั้ง 3 กรรมวิธีออกมาสัปดาห์ละ 10 หัว นำ 5 หัวไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของช่อดอก และอีก 5 หัวนำไปปลูกเพื่อศึกษาการพัฒนาของช่อดอกในสภาพแปลงปลูกตามธรรมชาติ

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของช่อดอกที่ใจกลางหัว ของหัวที่เก็บรักษาไว้ตามกรรมวิธีต่าง ๆ กัน ทำโดยนำหัวว่านมหาลาภขนาดต่าง ๆ ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 ° และ 10 °ซ และอุณหภูมิห้องมาสัปดาห์ละ 5 หัว แกะกาบใบของหัวออกทีละชั้น เมื่อถึงส่วนของช่อดอกที่อยู่ที่ใจกลางหัว ทำการวัดขนาดของช่อดอกและสังเกตความผิดปกติอันอาจเกิดขึ้นระหว่างการเก็บรักษา

การศึกษาความสามารถในการงอก และให้ดอกของหัวที่เก็บรักษาไว้ในกรรมวิธีต่าง ๆ ทำโดยนำหัวว่านมหาลาภขนาดต่าง ๆ ที่เก็บรักษาที่อุณภูมิ 5 °ซ 10 °ซ และอุณหภูมิห้องมาสัปดาห์ละ 5 หัว นำไปปลูกในแปลงทดลองในสภาพธรรมชาติ เพื่อทดสอบการให้ดอก

2.2.2 การบันทึกข้อมูล

2.2.2.1 ขนาดของช่อดอกในใจกลางของหัว โดยวัดความยาวจากโคนช่อดอกถึงปลายช่อดอก

2.2.2.2 ระยะเวลาตั้งแต่เริ่มปลูกจนถึงวันแทงช่อดอก

2.2.2.3 ความยาวของช่อดอกในแปลงปลูกทดสอบ บันทึกในวันที่ช่อดอกอยู่ในระยะการพัฒนาที่ดอกย่อยบานได้ 4 ดอกต่อช่อ

2.2.2.4 ลักษณะการผิดปกติอันอาจเกิดขึ้นเนื่องจากการเก็บรักษาหัวพันธุ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3 การศึกษาการปรับปรุงคุณภาพของช่อดอกหลังการเก็บเกี่ยว

การศึกษานี้เป็นการทดลองตัดช่อดอกว่านมหาลาภจากแปลงปลูกในสภาพธรรมชาติในระยะการเก็บเกี่ยวต่าง ๆ กัน แล้วนำมาทดสอบคุณภาพของช่อดอกในแจกันที่บรรจุน้ำยาต่าง ๆ เพื่อจุดประสงค์ของการช่วยปรับปรุงคุณภาพการบานของดอกและการยืดอายุการใช้งานของช่อดอกในแจกัน

2.3.1 การศึกษาระยะการพัฒนาของช่อดอกที่เหมาะสมในขณะเก็บเกี่ยวร่วมกับการใช้น้ำยาในการปรับปรุงคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยว

ทำการตัดช่อดอกมาจากแปลงปลูก โดยเก็บเกี่ยวช่อดอกที่มีระยะการพัฒนาของดอกย่อยบนช่อดอก แตกต่างกัน 3 ระยะ คือ

ระยะการพัฒนาที่ 1 ดอกย่อยในช่อบาน 1 ดอก (B1)

ระยะการพัฒนาที่ 2 ดอกย่อยในช่อบาน 2 ดอก (B2)

ระยะการพัฒนาที่ 3 ดอกย่อยในช่อบาน 3 ดอก (B3)

นำช่อดอกที่เก็บเกี่ยวมาปักในแจกันแก้ว ที่บรรจุน้ำยาที่มีส่วนผสมของน้ำตาลทรายขาว 4 ระดับคือ 0 2 5 และ 10 % โดยใช้ 8 HQS 300 สตล เป็นสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในทุกกรรมวิธีของน้ำยา

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) โดยจัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียล (Factorial) จำนวน 3 X 4 = 12 กรรมวิธี โดยแต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ช่อดอก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.2 การศึกษาผลของน้ำยาสูตรต่าง ๆ ที่มีต่อคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวของช่อดอก

2.3.2.1 การทดลองผลของ $AgNO_3$ ระดับต่าง ๆ ในน้ำยาที่มีส่วนประกอบของน้ำตาล 10% และ 8-HQS 300 สตล

ทดลองกับช่อดอกว่านมหาลาภที่มีระยะการพัฒนาของดอกย่อยในช่อดอก 3 ระยะคือ B1 B2 และ B3

ใช้ $AgNO_3$ 4 ระดับ คือ 0 25 50 และ 100 สตล ทำการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยจัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียล จำนวน 3 X 4 = 12 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ช่อดอก

2.3.2.2 การทดลองผลของ $Al_2(SO_4)_3$ ระดับต่าง ๆ ในน้ำยาที่มีส่วนผสมของน้ำตาล 10% และ 8-HQS 300 สตล

ทดลองกับช่อดอกที่มีระยะการพัฒนาของช่อดอกระยะ B2 และ B3

ใช้ $Al_2(SO_4)_3$ 3 ระดับ คือ 0 50 และ 100 สตล วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยจัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียล จำนวน 2 X 3 = 6 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ช่อดอก

2.3.2.3 การทดลองผลของกรดซิตริคและกรดเบนโซอิค ระดับต่าง ๆ ในน้ำยาที่มีส่วนผสมของน้ำตาล 10% และ 8-HQS 300 สตล ในการช่วยปรับปรุงคุณภาพของช่อดอก

ทดลองกับช่อดอกว่านมหาลาภที่มีระยะการพัฒนาของช่อดอกระยะ B1 B2 และ B3 ใช้กรดซิตริค และกรดเบนโซอิค 3 ระดับ คือ 0 250 และ 500 สตล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยจัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรี่ยล จำนวน 3 X 2 X 3 = 18 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ช่อดอก

2.3.2.4 การทดสอบผลของไคเนตินในน้ำยาที่มีส่วนผสมของน้ำตาล 10% และ 8-HQS 300 สตล ในการช่วยปรับปรุงคุณภาพของช่อดอก

ทดสอบกับช่อดอกว่านมหาลาภที่มีระยะการพัฒนาของช่อดอกระยะ B2 B3 และ B4 (ระยะการพัฒนาที่ 4 คือ ช่อดอกที่มีดอกย่อยในช่อบาน 4 ดอก)

ใช้ไคเนติน 4 ระดับ คือ 0 30 60 และ 120 สตล วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยจัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรี่ยล จำนวน 3 X 4 = 12 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ช่อดอก

การทดลองทุก ๆ การทดลองใน 2.3 น้ำยาที่ใช้ทดสอบ ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย ช่อดอกที่ได้รับการสุ่มเข้าไว้ในกรรมวิธีต่าง ๆ เมื่อจะทดสอบคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวของช่อดอกในขวดแก้วบรรจุน้ำยาสูตรต่าง ๆ จะตัดก้านช่อดอกให้เหลือความยาว 50 ซม แล้วแช่โคนก้านดอกลงในขวดแก้วดังกล่าว ตั้งขวดแก้วไว้ในห้องปฏิบัติการ

การบันทึกผลการทดลองทุกการทดลองใน 2.3 บันทึกดังนี้

1) จำนวนดอกย่อยที่สามารถบานได้ทั้งหมดต่อช่อ (ดอก)
2) จำนวนดอกย่อยที่บานในช่อในเวลาเดียวกัน (ดอก)
3) อายุการปักแจกันของช่อดอก (วัน)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อช่อดอกหมดอายุการปักแจกัน ทำการสุ่มตัดส่วนโคน ส่วนกลาง และส่วนปลายของก้านช่อดอก ยาวส่วนละประมาณ 5 มม กรรมวิธีละ 3 ตัวอย่าง นำไปศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา โดยวิธี paraffin embedding method (Johansen, 1940) เพื่อศึกษาลักษณะความเสียหายของก้านช่อดอก

2.4 การเก็บรักษาช่อดอกหลังการเก็บเกี่ยว

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมบางวิธีการในการเก็บรักษาช่อดอกหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อรอการจำหน่าย

2.4.1 การเก็บรักษาช่อดอกที่อุณหภูมิ 2 °ซ ร่วมกับการทำพัลซิ่ง

ทดสอบกับช่อดอกว่านมหาลาภที่มีระยะการพัฒนาระยะ B1 B2 และ B3 โดยการแบ่งช่อดอกออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มหนึ่งทำการพัลซิ่งด้วยน้ำยาที่มีส่วนผสมของ น้ำตาล 10% และ 8-HQS 300 สตล เป็นเวลา 12 ชั่วโมง อีกกลุ่มหนึ่งไม่ทำการพัลซิ่ง เพียงแต่แช่ก้านช่อดอกไว้ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เช่นกัน จากนั้นนำช่อดอกทั้ง 2 กลุ่มมาบรรจุห่อ ชั้นแรกห่อด้วยแผ่นพลาสติกใส แล้วห่อทับด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ 2 ชั้นอีกครั้งหนึ่ง เก็บรักษาช่อดอกในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ระดับ 2 °ซ หลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 0 2 และ 4 วัน นำช่อดอกออกจากตู้เก็บรักษามาทดสอบคุณภาพของช่อดอกในขวดแก้วที่บรรจุน้ำกลั่น วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยจัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียล จำนวน 3 X 2 X 2 = 12 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ช่อดอก

2.4.2 การเก็บรักษาช่อดอกที่อุณหภูมิห้อง ร่วมกับการให้ก้านช่อดอกได้รับน้ำก่อนการเก็บรักษา

ทดลองกับช่อดอกที่มีระยะการพัฒนา B2 และ B3 ทำการแบ่งช่อดอกที่มีความยาวของก้านช่อดอก 60 ซม ออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มหนึ่งนำไปแช่ก้านดอกในน้ำกลั่นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อีกกลุ่มหนึ่งไม่แช่ก้านดอกในน้ำ เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำมาห่อเช่นเดียวกับในการทดลองที่ 2.4.1 แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง นำช่อดอกออกมาทำการทดสอบคุณภาพภายหลังการเก็บรักษา ในขวดแก้วบรรจุน้ำกลั่น โดยตัดก้านช่อดอกทิ้งไป 10 ซม ก่อนจะแช่ก้านช่อดอกในขวดแก้วทดสอบ นำช่อดอกออกมาทดสอบในขวดแก้วในวันที่ 0 2 และ 4 วัน ของการเก็บรักษา วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยจัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียล จำนวน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2 X 2 X 3 = 12 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ช่อดอก ตั้งขวดแก้วทดสอบไว้ในห้องปฏิบัติการ และบันทึกผลการทดลองในลักษณะเดียวกันกับการทดลองใน 2.3

3. สถานที่ที่ใช้ในการทดลองและรวบรวมข้อมูล

3.1 แปลงปลูกพืชทดลองของศูนย์บริการการพัฒนาและขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.หางดง จ.เชียงใหม่

3.2 ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

4. ระยะเวลาในการดำเนินการทดลอง

เริ่มทำการทดลองเมื่อวันที่ 10 พฤศจิกายน 2533 สิ้นสุดการทดลองเมื่อวันที่ 31 สิงหาคม 2534

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved