

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ

1. อุปกรณ์

วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองมี ดังนี้

1.1 พืชทดลอง

พืชที่ใช้ทดลองคือ วานนางคุ่ม และกระเจียวตีชมพู ซึ่งเป็นหัวพันธุ์ที่ได้จาก ศูนย์บริการ
การพัฒนาและขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่
ใช้หัวพันธุ์วานนางคุ่ม 5 ขนาด คือ ขนาด A, B, C, D และ E ซึ่งมีเส้นรอบวง 7.1-8.0, 6.1-7.0,
5.1-6.0, 4.1-5.0 และ 3.1-4.0 เซนติเมตร ตามลำดับ และหัวพันธุ์กระเจียวมีขนาดเส้นรอบวง
2.5-3.0 เซนติเมตร

1.2 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบอายุการปักแจกันของดอก

1.2.1 ขวดแก้วขนาด 800 มิลลิลิตร

1.2.2 เวอร์เนีย

1.2.3 แผ่นเทียบสีของ The Royal Horticultural Society ประเทศอังกฤษ

1.3 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บรักษาช่อดอก

1.3.1 กล่องกระดาษลูกฟูกขนาด 120 X 50 X 30 เซนติเมตร

1.3.2 กระดาษลอกลาย

1.3.3 ห้องควบคุมอุณหภูมิ 3 ห้องที่ควบคุมอุณหภูมิให้เป็น 5, 10 และ 15 องศาเซลเซียส

1.4 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารละลายเคมีเพื่อปรับปรุงคุณภาพดอก

- 1.4.1 น้ำตาลทรายขาว
- 1.4.2 8-HQS (8-hydroxyquinoline sulfate) (บริษัท Fluka AG ประเทศสวิทเซอร์แลนด์)
- 1.4.3 AgNO_3 (Silver nitrate) (บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน)
- 1.4.4 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

1.5 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาเนื้อเยื่อ

- 1.5.1 เครื่องตัดชิ้นส่วนพืชแบบล้อหมุน (rotary microtome)
- 1.5.2 ตู้อบ (hot air oven)
- 1.5.3 แผ่นให้ความร้อน (hot plate)
- 1.5.4 กล้องจุลทรรศน์สองตาแบบสเตอริโอ (stereo microscope)
- 1.5.5 กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ (photomicroscope)
- 1.5.6 แท่งไม้ขนาด $1.5 \times 1.5 \times 1.5$ เซนติเมตร ที่ดัดให้อิ่มตัวในพาราฟิน
- 1.5.7 หลอดแก้วสำหรับใส่ชิ้นส่วนพืช (vial)
- 1.5.8 กระจกสไลด์และกระจกปิดสไลด์ (slide and cover slip)
- 1.5.9 ขวดแก้วสำหรับย้อมสี (staining jar)
- 1.5.10 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 1.5.11 วัสดุอื่นๆ ได้แก่ มีดผ่าตัด และปากคีบ

1.6 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาเนื้อเยื่อ

1.6.1 น้ำยาที่ใช้ในการฆ่าเซลล์และรักษาสภาพเซลล์ (killing and fixing solution) คือ FAA (formalin-acetic acid-alcohol) มีส่วนผสมของสารเคมี ดังนี้

(95 per cent) ethyl alcohol	50 เปอร์เซ็นต์
glacial acetic acid	5 เปอร์เซ็นต์
Formalin	10 เปอร์เซ็นต์
น้ำกลั่น	35 เปอร์เซ็นต์

1.6.2 น้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution) ประกอบด้วย (95 per cent) ethyl alcohol, absolute alcohol, tertiary butyl alcohol (TBA) และน้ำกลั่น โดยใช้ส่วนผสมในอัตราที่แตกต่างกัน 4 ระดับ ตามวิธีของ Sass (1996) ดังนี้

ตารางที่ 1. อัตราส่วนของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์

ปริมาณ (มิลลิลิตร)	ระดับ (เปอร์เซ็นต์)				
	50	70	85	95	100
(95 per cent) ethyl alcohol	40	50	50	45	-
absolute alcohol	-	-	-	-	25
TBA	10	20	35	55	75
น้ำกลั่น	50	30	15	-	-

1.6.3 Paraffin oil

1.6.4 สารตัวกลางที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อ (embedding media) ได้แก่ (Paraplast)

1.6.5 น้ำยาคัดเนื้อเยื่อให้ติดแผ่นสไลด์ (adhesive) คือ stock solution ของน้ำยาที่มีส่วนผสม ดังนี้

ไขขาว 1 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น 49 มิลลิลิตร

นำ stock solution 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ครบ 50 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปใช้

1.6.6 น้ำยาทำให้เนื้อเยื่อใสสะอาด (clearing reagent) ได้แก่ xylol

1.6.7 สีย้อมเนื้อเยื่อ ได้แก่ Delafield's hematoxylin มีส่วนผสม ดังนี้

ammonium aluminium sulphate (อิมตัวในน้ำ) 400 มิลลิลิตร

hematoxylin 4 กรัม

(95 per cent) ethyl alcohol 25 มิลลิลิตร

methyl alcohol 100 มิลลิลิตร

glycerol 100 มิลลิลิตร

1.6.8 สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นสไลด์ คือ Canada balsam

2. วิธีการ

การทดลองนี้เป็นการทดลองเพื่อศึกษา ผลของสารละลายเคมีที่มีต่อดอกกว่านนางคุ่ม และดอกกระเจียว ในการปรับปรุงคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวของดอก แบ่งการทดลองออกเป็น 5 การทดลองย่อย

วิธีการในการทดลองมี ดังนี้

2.1 การทดลองที่ 1 ผลของระยะการเจริญเติบโตของดอกขณะเก็บเกี่ยว

2.1.1 การเตรียมสิ่งทดลอง

ปลูกหัวพันธุ์พืชทดลองทั้ง 2 ชนิด ในฤดูกาลปกติเพื่อการตัดช่อดอกมาทดลอง ในกรรมวิธีการทดลองที่กำหนดไว้ในแต่ละการทดลองย่อย

เก็บเกี่ยวช่อดอกกว่านนางคุ่มที่ปลูกจากหัวพันธุ์ขนาด A, B, C, D และ E โดยเก็บเกี่ยวในระยะการเจริญเติบโต 2 ระยะ คือ ระยะที่ 1 ดอกย่อยบาน 3 ดอกต่อช่อ และระยะที่ 2 ดอกย่อยบาน 6 ดอกต่อช่อ ส่วนช่อดอกกระเจียวเก็บเกี่ยวช่อดอก 4 ระยะ ทั้งนี้พิจารณาระยะดอกบานของกระเจียวโดยถือว่ากลีบประดับเป็นเสมือนกลีบดอกของช่อดอก เนื่องจากดอกจริงของกระเจียวเป็นดอกที่เจริญเติบโตอยู่ที่ซอกของกลีบประดับ ดอกจริงเหล่านี้มีอายุการบานสั้นมาก กล่าวคือประมาณ 1 วัน และภายในซอกของกลีบประดับนั้นมีดอกจริงเจริญเติบโตอยู่ภายในในปริมาณที่ไม่แน่นอน โดยที่บางกลีบประดับจะไม่มีดอกอยู่เลย หรืออาจจะมีดอกหลายดอกก็ได้ ดังนั้นในทางการใช้ประโยชน์ของช่อดอกกระเจียวจึงเป็นการใช้ประโยชน์กลีบประดับมากกว่าใช้ประโยชน์ดอกจริง จึงถือเอาการบานของกลีบประดับ และอายุการใช้งานของกลีบประดับบนช่อดอกแทนการใช้งานของดอกจริง ซึ่งจะมีอายุการบานสั้นมาก ดังนั้นระยะเก็บเกี่ยวช่อดอกกระเจียวในการทดลองนี้จึงแบ่งเป็น 4 ระยะ คือ ระยะที่ 1 ดอกตูมทั้งช่อ (กลีบประดับยังไม่บาน) ระยะที่ 2 ดอกบานได้ $\frac{1}{3}$ ของช่อ (กลีบประดับบานได้ $\frac{1}{3}$ ของช่อ) ระยะที่ 3 ดอกบานได้ $\frac{2}{3}$ ของช่อ (กลีบประดับบานได้ $\frac{2}{3}$ ของช่อ) และระยะที่ 4 ดอกบานทั้งช่อ (กลีบประดับบานหมดทั้งช่อ)

2.1.2 การทดสอบอายุการปักแจกันและคุณภาพของดอกในแจกัน
ปักก้านช่อดอกที่เป็นสิ่งทดลองลงในขวดแก้วบรรจุน้ำกลั่น นำไปวางทดสอบในห้องปฏิบัติการ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2.1.3 การบันทึกผลการทดลอง
บันทึกผลการทดลองในลักษณะของอายุการปักแจกัน และคุณภาพของช่อดอก กล่าวคือ ความแข็งแรงของก้านช่อดอก สภาพและสีของกลีบดอกหรือกลีบประดับ การบานของดอกย่อย และขนาดของช่อดอกเมื่อช่อดอกบานเต็มที่ในแต่ละกรรมวิธี

2.1.4 ศึกษาเนื้อเยื่อท่อลำเลียงของก้านช่อดอก
ศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายวิภาคในท่อลำเลียงน้ำและอาหารของก้านช่อดอกในกรรมวิธีเท่าที่จำเป็น โดยใช้วิธี Paraffin Embedding Method ดังที่บรรยายไว้โดย Johansen (1940)

2.2 การทดลองที่ 2 ผลของสารละลายเคมีในลักษณะ pulsing

2.2.1 การทดสอบอายุการปักแจกันและคุณภาพของดอกในแจกัน
ปักก้านช่อดอกที่เป็นสิ่งทดลองลงในขวดแก้ว ที่มีสารละลาย pulsing กรรมวิธีต่างๆ ซึ่งมีส่วนผสมของน้ำตาลทรายขาว 4 ระดับ คือ 5,10,15 และ 20เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ $AgNO_3$ 50 ส่วนต่อล้าน และ 8-HQS 200 ส่วนต่อล้าน และใช้ช่อดอกของดอกไม้ทั้ง 2 ชนิด ดังข้อ 2.1.1 แซ่ก้านช่อดอกไว้ในน้ำยา pulsing กรรมวิธีต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำขึ้นมาและนำไปทดสอบอายุการปักแจกันและคุณภาพของช่อดอก ในขวดแก้วที่บรรจุน้ำกลั่นวางขวดแก้วไว้ในห้องปฏิบัติการ ดังข้อ 2.1.2

2.1.2 การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกผลการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.1.3

2.1.3 ศึกษาเนื้อเยื่อท่อลำเลียงของก้านช่อดอก

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายวิภาคเช่นเดียวกับข้อ 2.1.4

2.3 การทดลองที่ 3 ผลของสารละลายเคมีในลักษณะ holding

2.3.1 การทดสอบอายุการปักแจกัน และคุณภาพของดอกในแจกัน

ปักแจกันช่อดอกที่เป็นสิ่งทดลองดั่งข้อ 2.1.1 ลงในขวดแก้วที่มีสารละลาย holding ซึ่งมีส่วนผสมของน้ำตาลทรายขาว 3 ระดับ คือ 2, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ AgNO_3 50 ส่วนต่อล้าน และ 8-HQS 200 ส่วนต่อล้าน หรือ STS (AgNO_3 0.169 กรัมต่อลิตร + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.632 กรัมต่อลิตร) วางขวดแก้วไว้ในห้องปฏิบัติการ ดั่งข้อ 2.1.2

2.3.2 การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกผลการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.1.3

2.3.3 ศึกษาเนื้อเยื่อท่อลำเลียงของแจกันช่อดอก

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายวิภาคเช่นเดียวกับข้อ 2.1.4

2.4 การทดลองที่ 4 ผลของสารละลายเคมีในลักษณะ pulsing ร่วมกับการเก็บรักษาช่อดอกในตู้ควบคุมอุณหภูมิ

2.4.1 การทดสอบอายุการปักแจกัน และคุณภาพของดอกในแจกัน

ทำการ pulsing ช่อดอกที่เป็นสิ่งทดลองตามกรรมวิธีการทำ pulsing ที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 โดยใช้ช่อดอกที่เตรียมดั่งข้อ 2.1.1 ของดอกไม้ทั้ง 2 ชนิด หลังจากทำ pulsing แล้วนำช่อดอกบรรจุในกล่องกระดาษลูกฟูกที่ปิดฝาสนิทแล้วนำกล่องไปเก็บรักษาไว้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิให้เป็น 5, 10 และ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 วัน เมื่อครบกำหนดในแต่ละกรรมวิธีแล้วจึงนำกล่องกระดาษมาแกะ นำช่อดอกมาตัดโคนแจกันช่อดอกออกประมาณ 2.5 เซนติเมตร แล้วนำไปปักทดสอบในขวดแก้วที่บรรจุน้ำกลั่น วางขวดแก้วไว้ในห้องปฏิบัติการ ดั่งข้อ 2.1.2

2.4.2 การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกผลการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.1.3

2.4.3 ศึกษาเนื้อเยื่อท่อลำเลียงของก้านช่อดอก

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายวิภาคเช่นเดียวกับข้อ 2.1.4

2.5 การทดลองที่ 5 ผลของสารละลายเคมีในการปรับปรุงคุณภาพช่อดอกที่ผลิตนอกฤดู

ปลูกหัวพันธุ์ของพืชทดลองทั้ง 2 ชนิด ในสภาพนอกฤดูปลูกปกติ โดยปลูกในช่วงเดือนเมษายนถึงกรกฎาคม และเก็บเกี่ยวช่อดอกมาทดสอบ สำหรับว่านางคัมทำการเก็บเกี่ยวช่อดอกในเดือนพฤษภาคม-กรกฎาคม โดยมีกรรมวิธีการทดลอง ดังนี้

2.5.1 การทดสอบอายุการปักแจกัน และคุณภาพของดอกในแจกัน

ปักก้านช่อดอกที่เป็นสิ่งทดลองซึ่งเก็บเกี่ยวช่อดอกในระยะดังข้อ 2.1.1 ลงในขวดแก้วที่มีส่วนผสมของสารละลาย holding ที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 3

2.5.2 การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกผลการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.1.3

2.5.3 ศึกษาเนื้อเยื่อท่อลำเลียงของก้านช่อดอก

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายวิภาคเช่นเดียวกับข้อ 2.1.4

3. การวางแผน และวิเคราะห์ผลการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) โดยจัดตั้งทดลองแบบ factorial

การทดลองที่ 1 มี 6 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ โดยใช้ช่อดอก 1 ช่อดอกต่อซ้ำ ปัจจัยที่ศึกษาคือ ผลของขนาดช่อดอกที่แตกต่างกันเนื่องจากเจริญเติบโตจากหัวพันธุ์ที่มีขนาดแตกต่างกัน และระยะเวลาการเก็บเกี่ยวของช่อดอกที่มีต่อคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวของช่อดอก

การทดลองที่ 2 มี 36 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ โดยใช้ช่อดอก 1 ช่อดอกต่อซ้ำ
ปัจจัยที่ศึกษาคือ ผลของขนาดช่อดอก ระยะการเก็บเกี่ยวของช่อดอก และสูตร (ส่วนผสม) ของ
น้ำยา pulsing ที่มีต่อคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวของช่อดอก

การทดลองที่ 3 มี 36 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ โดยใช้ช่อดอก 1 ช่อดอกต่อซ้ำ
ปัจจัยที่ศึกษาคือ ผลของขนาดช่อดอก ระยะการเก็บเกี่ยวของช่อดอก และสูตร (ส่วนผสม) ของ
น้ำยา holding ที่มีต่อคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวของช่อดอก

การทดลองที่ 4 มี 6 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ โดยใช้ช่อดอก 1 ช่อดอกต่อซ้ำ
ปัจจัยที่ศึกษาคือ อุณหภูมิของห้องเก็บรักษาช่อดอก และจำนวนวันที่ทำการเก็บรักษาช่อดอกที่มี
ต่อคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวของช่อดอก

การทดลองที่ 5 มี 12 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ โดยใช้ช่อดอก 1 ช่อดอกต่อซ้ำ
ปัจจัยที่ศึกษาคือ ผลของขนาดช่อดอก ระยะการเก็บเกี่ยวของช่อดอก และสูตร (ส่วนผสม) ของ
น้ำยา pulsing ที่มีต่อคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวของช่อดอก

วิเคราะห์ผลการทดลอง โดยวิธี statistic version 3.5