บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 ผลของอุณหภูมิดินต่อการเจริญเติบโต การออกดอก และผลผลิตของฟรีเซีย

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1.1 อุปกรณ์

1.1.1 หัวฟรีเซียพันธุ์ Diva มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 – 5 เซนติเมตร (ซม)

1.1.2 แปลงปลูกขนาด 1.2 × 3 เมตร (ม) สูง 20 ซม จำนวน 2 แปลง

1.1.3 วัสดุปลูกได้แก่ ดิน ทราย ขุยมะพร้าว และขี้เถ้าแกลบ อัตราส่วน 1:1:1:1

1.1.4 ท่อเหล็กขนาด 1 นิ้ว

1.1.5 ระบบทำความเย็น

1.1.6 แผ่นโฟม และตาข่าย

1.1.7 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

1.1.7.1 หลอดแก้ว (vial) สำหรับใส่น้ำยาเคมี และเนื้อเยื่อตัวอย่าง

1.1.7.2 ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ระดับ 56 °ซ

1.1.7.3 เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุน (rotary microtome)

1.1.7.4 แท่งไม้ขนาด 3.5 ซม^3 ที่ผ่านการต้มให้อิ่มตัวในพาราฟิน

1.1.7.5 แผ่นสไลด์พร้อมแผ่นปิดสไลด์

1.1.7.6 ขวดแก้วสำหรับย้อมสีเนื้อเยื่อ

1.1.7.7 กล้องจุลทรรศน์ พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

1.1.7.8 อุปกรณ์อื่นๆ เช่น ตะเกียงแอลกอฮอล์ เข็มเขี่ย และใบมีดโกน

1.1.8 สารเคมีในการเตรียมเนื้อเยื่อพืชที่ใช้ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา (ภูวดล, 2528; Johansen, 1940)

1.1.8.1 น้ำยาสำหรับฆ่าและรักษาสภาพเซลล์ (killing and fixing solution) ได้แก่ FAA (formalin – actic acid – alcohol) ประกอบด้วย

ethyl alcohol 95%	50	มล
glacial acetic acid	5	มล
formalin	10	มล
น้ำกลั่น	35	มล

1.1.8.2 น้ำยาสำหรับดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution) ประกอบด้วย ethyl alcohol, tertiary butyl alcohol (TBA) และน้ำกลั่น ในอัตราส่วนที่ต่างกัน ตั้งแต่ระดับ 50% จนถึง 100% ของ TBA (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 อัตราส่วนของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้สำหรับดึงน้ำออกจากเซลล์

ความเข้มข้น (%)	อัตราส่วนของส่วนผสม (มล)			
	ethyl alcohol 95%	ethyl alcohol 100%	TBA	น้ำกลั่น
1 50%	40	-	10	50
2 70%	50	-	20	30
3 85%	50	-	35	15
4 95%	45	-	55	-
5 100%	-	25	75*	-

* ผสมสี erythrosin

1.1.8.3 สารตัวกลางที่ใช้ในการฝังเนื้อเยื่อเพื่อการตัด (embedding media) ได้แก่ paraplast

1.1.8.4 น้ำยายึดเนื้อเยื่อพืชให้ติดแผ่นสไลด์ (adhesive) เตรียมน้ำยา stock โดยใช้ส่วนผสมของไข่ขาว 1 มล น้ำกลั่น 49 มล เมื่อจะใช้ นำน้ำยา stock 1 มล เติมน้ำกลั่นให้เป็น 50 มล

1.1.8.5 น้ำยาทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing reagent) ได้แก่ xylene

1.1.8.6 สีสังเคราะห์สำหรับย้อมสีเนื้อเยื่อคือ Dalafield's hematoxylin ซึ่งประกอบด้วย

aluminium sulphate $[Al_2(SO_4)_3 \cdot 15H2O]$ 400 มล

hematoxylin	4	กรัม
ethyl alcohol 95%	25	มล
methyl alcohol	100	มล
glycerine	100	มล

1.1.8.7 สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นสไลด์ (mounting media) ได้แก่ Canada balsam

1.2 วิธีการทดลอง

ปลูกหัวฟรีเซียในแปลงซึ่งอยู่ในโรงเรือนพลาสติก ใช้วัสดุปลูกประกอบด้วย ดินทราย ขุยมะพร้าว และขี้เถ้าแกลบในอัตราส่วน 1:1:1:1 ใช้ระยะปลูก 15 × 15 ซม แบ่งแปลงปลูกออกเป็น 2 กรรมวิธี

กรรมวิธีที่ 1 เป็นแปลงควบคุม (control) จำนวน 1 แปลงที่ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ

กรรมวิธีที่ 2 ควบคุมอุณหภูมิดินในแปลงให้ต่ำกว่าปกติ อยู่ในช่วง 15 ± 3 °ซ โดยใช้น้ำเย็นที่ควบคุมอุณหภูมิด้วยระบบทำความเย็นไหลผ่านท่อเหล็กที่วางไว้ใต้แปลงจำนวน 7 เส้น ระบบการหมุนวนของน้ำอาศัยการทำงานของปั๊ม เทอร์โมสแตต และเทอร์โมมิเตอร์วัดอุณหภูมิ (ภาพที่ 1 และ 2)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) จำนวน 2 กรรมวิธีๆ ละ 15 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี T – test

ก แปลงมีท่อน้ำเย็น ข แปลงควบคุม

ภาพที่ 1 แปลงปลูก

ภาพที่ 2 เครื่องควบคุมอุณหภูมิน้ำ และระบบการวางท่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

บันทึกผลการทดลอง

1.2.1 การเจริญเติบโต

- ความสูงของต้น (ซม) วัดจากโคนต้นถึงปลายใบที่สูงที่สุดโดยรวบใบขึ้น
- จำนวนใบต่อต้น

1.2.2 การออกดอกและคุณภาพดอก

- จำนวนวันตั้งแต่ปลูกถึงแทงช่อและวันที่ดอกแรกบาน
- ความยาวก้านช่อวัดจากโคนต้นจนถึงปลายช่อ (ซม)
- จำนวนดอกย่อยต่อช่อหลัก
- จำนวนช่อดอกต่อต้น

1.2.3 ผลผลิตหัวพันธุ์

- ขนาดเส้นรอบวงของหัวใหม่ (ซม)
- ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (ซม)
- น้ำหนักของหัวใหม่ (กรัม)
- จำนวนหัวพันธุ์

1.2.4 การสร้างและพัฒนาตาดอกทางเนื้อเยื่อวิทยา Paraffin embedding technique ของ Johansen (1940) ดังนี้

เก็บตัวอย่างพืชทดลองที่ได้จากทั้ง 2 กรรมวิธีในช่วงระยะเวลาที่มีการเจริญเติบโตตั้งแต่เดือนพฤศจิกายนถึงต้นเดือนธันวาคมทุกสัปดาห์ สัปดาห์ละ 20 หัว มาศึกษาเนื้อเยื่อวิทยา เพื่อติดตามการพัฒนาของตาดอก โดยมีขั้นตอนดังนี้

1.2.4.1 เก็บตัวอย่างใส่ลงในขวดแก้วที่บรรจุน้ำยา FAA

1.2.4.2 ทำการดึงน้ำออกจากเซลล์ของเนื้อเยื่อ โดยผ่านเนื้อเยื่อที่ทำการตรึงและรักษาสภาพเซลล์แล้วนั้น ลงในน้ำยาที่ใช้ในการดึงน้ำออกจากเซลล์ตามลำดับจากน้ำยาระดับที่ 1 ไปจนถึงระดับที่ 5 ของน้ำยาที่กล่าวไว้ในข้อ 1.1.8.2 หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อไปผ่าน TBA บริสุทธิ์อีกครั้ง ในแต่ละขั้นตอนใช้เวลา 6 – 12 ชั่วโมง

1.2.4.3 ทำการแทรกพาราฟินให้ซึมเข้าเนื้อเยื่อ โดยนำเนื้อเยื่อไปแช่ลงในส่วนผสมของพาราฟินเหลว และ TBA อัตราส่วน 1:1 แช่ทิ้งไว้ 1 คืน หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อลงแช่ในพาราฟินที่หลอมไว้ในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 56 °ซ นาน 2 – 3 วัน

1.2.4.4 ฝังชิ้นส่วนเนื้อเยื่อใน paraplast ในขณะที่ฝังเนื้อเยื่อใช้เข็มเขี่ยหรือใบมีดลนไฟให้ร้อน ไล่ฟองอากาศที่อยู่ในพาราฟินออกให้หมด พร้อมทั้งจัดเรียงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อให้อยู่ในระนาบ และตำแหน่งที่ต้องการตัด

1.2.4.5 ติดแท่งพาราฟินที่ฝังเนื้อเยื่อแล้วบนแท่งไม้แล้วนำไปตัด โดยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุน ตัดเนื้อเยื่อหนา 13 – 15 ไมครอน

1.2.4.6 ติดแผ่นริบบอนเนื้อเยื่อบนแผ่นสไลด์ โดยใช้ adhesive ขณะที่วางแผ่นสไลด์บนแผ่นให้ความร้อน เมื่อแผ่นริบบอนติดแน่นบนแผ่นสไลด์ดีแล้วจึงนำไปผ่าน xylene เพื่อละลายพาราฟินออกก่อนนำไปย้อมสี

1.2.4.7 ย้อมสีเนื้อเยื่อด้วยสี Delafield's hematoxylin

1.2.4.8 ปิดแผ่นสไลด์หลังจากสีแห้งแล้วโดยใช้ Canada balsam

การทดลองที่ 2 ผลของอุณหภูมิดินต่อการสะสมปริมาณแป้ง น้ำตาล และคลอโรฟิลล์

อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 อุปกรณ์

2.1.1 เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

2.1.2 เครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลองทางเคมี เช่น บีกเกอร์ ปิเปต หลอดทดลอง ขวดปรับปริมาตร แท่งแก้วคน กรวย กระบอกตวง เป็นต้น

2.1.3 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

2.1.4 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง

2.1.5 เครื่องเขย่า

2.1.6 อ่างควบคุมอุณหภูมิ

2.1.7 อุปกรณ์อื่นๆ เช่น กระดาษกรอง โกร่ง

2.2 วิธีการทดลอง

สุ่มพืชจากการทดลองที่ 1 ในระยะการเจริญเติบโตต่างกันจำนวน 4 ซ้ำต่อกรรมวิธี

ระยะที่ 1 หัวพันธุ์เริ่มต้นที่ใช้ปลูก

ระยะที่ 2 ต้นที่กำลังเจริญเติบโตหลังปลูก 1 เดือน

ระยะที่ 3 ต้นที่อยู่ในช่วงออกดอก (20 สัปดาห์หลังปลูก)

ระยะที่ 4 ต้นที่เข้าสู่ระยะพักตัว (28 สัปดาห์หลังปลูก)

นำพืชที่สุ่มได้มาแยกส่วนต่างๆ คือ ลำต้นและใบ หัว ช่อดอกและดอก ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นจำนวน 2 ครั้ง ก่อนนำมาวิเคราะห์สารต่างๆ ตามวิธีการดังนี้

2.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ (Witham *et al.*, 1971)

การสกัดพืช

ชั่งตัวอย่างพืช 0.5 กรัม เติมอะซิโตนความเข้มข้น 80% 10 มล ลงไปบดให้ละเอียด เทสารสกัดผ่านกระดาษกรองลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มล จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 25 มล นำสารสกัดไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 645 และ 663 nm นำค่าที่ได้ไปคำนวณ ตามสูตรดังนี้

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์} = \frac{[20.2\, D_{(645)} + 8.02\, D_{(663)}]\, V \times 100}{1000 \times W}$$

มีหน่วยเป็น มก ของคลอโรฟิลล์ต่อ กรัม น้ำหนักสด (มก / กรัมน้ำหนักสด)

D_{645} = ค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 645 nm

D_{663} = ค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 663 nm

V = ปริมาตรของอะซิโตนที่ใช้ (25 มล)

W = น้ำหนักสดของตัวอย่าง (0.5 กรัม)

2.2.2 การวิเคราะห์น้ำตาลและแป้ง

2.2.2.1 การสกัดพืชเพื่อวิเคราะห์น้ำตาล

ชั่งตัวอย่างสด 4 กรัม สกัดด้วย ethyl alcohol 100% จำนวน 11.2 มล บดให้ละเอียดในโกร่งจากนั้นเทใส่หลอดเซนติฟิวส์ขนาด 50 มล ล้างตะกอน 3 ครั้ง ปิดหลอดด้วย vinyl tape นำไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 70 นาน 15 นาที จากนั้นนำไปแยกส่วนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนสารละลายใสลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มล ล้างตะกอนด้วย ethyl alcohol 80% 2 ครั้ง จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 50 มล ด้วย 80% ethyl alcohol สารสกัดส่วนนี้ใช้สำหรับวิเคราะห์น้ำตาล กากที่เหลือนำไปอบแห้งเพื่อใช้วิเคราะห์แป้ง

2.2.2.2 การสกัดพืชเพื่อวิเคราะห์แป้ง

ชั่งกากอบแห้งที่ได้จากข้อ 2.2.2.1 0.5 กรัม ใส่ลงในหลอดเซนติฟิวส์ขนาดใหญ่ เติมน้ำกลั่น 2.5 มล นำไปตั้งบนอ่างควบคุมอุณหภูมิ 100 °ซ นาน 15 นาที ยกลงมาเติมกรดเปอร์คลอริก 8.14 N ปริมาตร 3.25 มล ใช้แท่งแก้วคนให้ทั่วนาน 5 นาที จากนั้นคนเป็นครั้งคราว นาน 15 นาที เติมน้ำกลั่น 10 มล นำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนของเหลวลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มล ระวังอย่าให้ตะกอนลงไป ตะกอนที่เหลือให้ทำซ้ำในขั้นตอนตั้งแต่เติมกรดเปอร์คลอริกอีกครั้ง นำสารที่สกัดได้ไปปรับปริมาตรให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 50 มล จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรองและเก็บในขวดพลาสติก

2.2.2.3 การวิเคราะห์น้ำตาลโดยวิธี Phenol – sulphuric method ของ Dubois *et al.* (1956)

1 เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0, 50 และ 100 ไมโครลิตร

2 เตรียมสารละลายฟีนอล 5%

3 ดูดสารสกัดจากข้อ 2.2.2.1 จำนวน 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดแก้ว สำหรับสารละลายมาตรฐานให้ทำด้วยวิธีเดียวกัน

4 เติมน้ำกลั่น 1 มล

5 เติมฟีนอล 5% 1 มล

6 เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มล

7 นำไปเขย่าทันทีด้วยเครื่องปั่น (vertex)

8 ตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีแล้วเขย่าอีกครั้ง จากนั้นนำไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 30 °ซ นาน 10 นาทีเพื่อลดอุณหภูมิลง

9 นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 485 nm

10 ในแต่ละตัวอย่างจะต้องทำ blank โดยการดูดตัวอย่าง 10 ไมโครลิตรลงในหลอดแก้ว จากนั้นเติมน้ำกลั่น 2 มล แล้วทำตามตั้งแต่ขั้นตอนที่ 6

11 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ของตัวอย่างมาลบออกด้วยค่าการดูดกลืนแสงของ blank ของแต่ละตัวอย่าง (ถ้าใกล้เคียง 0 มากสามารถตัดทิ้งได้) นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

การคำนวณความเข้มข้นของน้ำตาล

ความเข้มข้นของน้ำตาล = $\frac{X \times D \times F}{FW}$ ไมโครกรัม / กรัม FW

X = ค่าความเข้มข้นที่ได้จากการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

D = ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้

F = ปริมาตรที่ใช้ในขั้นตอนการสกัดด้วย ethyl alcohol 80%

FW = น้ำหนักที่ใช้ในขั้นตอนการสกัดด้วย ethyl alcohol 80%

2.2.2.4 การวิเคราะห์แป้ง (JSPN, 1990)

1 เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส ที่ระดับ 0, 10 และ 20 สตล

2 เจือจางสารสกัดในข้อ 2.2.2.2 ปริมาตร 100 เท่า

3 นำสารละลายที่เจือจางได้มา 2.5 มล ใส่ในหลอดเซนติฟิวส์ที่ตั้งไว้ในกล่องน้ำแข็ง

4 เติมสารละลาย anthrone 5 มล

5 ปั่นให้เข้าด้วยกันด้วยเครื่องปั่น แล้วรีบนำลงไปไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 100 °ซ นาน 7.5 นาที

6 นำไปแช่ในกล่องน้ำแข็งเพื่อลดอุณหภูมิ

7 นำออกมาตั้งไว้รอจนกระทั่งอุณหภูมิใกล้เคียงอุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 630 nm

8 ค่าที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับกราฟของสารละลายมาตรฐาน

การคำนวณ

ปริมาณแป้ง สตล (X) = ความเข้มข้นน้ำตาล × 0.9

ปริมาณแป้งต่อน้ำหนักแห้ง = $\frac{X \times F \times d}{1000 \times D}$ มก / กรัม DW

X = ปริมาณแป้ง (สตล)

F = ปริมาตรที่ใช้ในขั้นตอน hydrolysis

d = จำนวนเท่าที่เจือจาง

D = น้ำหนักแห้งที่นำมาสกัด (กรัม)

สถานที่ทำการวิจัย

1. แปลงทดลองของโครงการหลวงอินทนนท์ อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

เดือนตุลาคม 2541 ถึง ตุลาคม 2543

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University