บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 กุหลาบพันธุ์ Dallas สีแดง

1.2 กรรไกรตัดแต่งกิ่ง

1.3 ขวดสำหรับปักแจกันกว้าง 8 เซนติเมตร สูง 16 เซนติเมตร

1.4 กระดาษกราฟ

1.5 โกร่งบด

1.6 ตู้เย็น

1.7 กระดาษกรอง

1.8 กระดาษกรอง Whatman No. 1

1.9 กระดาษปรู้ฟ

1.10 กล่องกระดาษ

1.11 เครื่องแก้ว ได้แก่

- บีกเกอร์ (beaker)
- ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)
- ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask)
- กระบอกตวง (cylinder)
- กรวยกรอง (filtering glass funnel)
- แท่งแก้วสำหรับคนสาร (stirrer)
- จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (plate)

1.12 เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น BA 3100P ของบริษัท Sartorius และแบบทศนิยม 4 ตำแหน่งรุ่น AB54 ของบริษัท Mettler Toledo

1.13 เครื่องวัดสี (chromameter) รุ่น CR-300 ของบริษัท Minolta หัววัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ซึ่งวัดสีออกมาเป็นค่า L* , a* , b* โดยมีรายละเอียดดังนี้

L* แสดงความสว่างเมื่อมีค่าใกล้ 100 และแสดงความมืดเมื่อมีค่าใกล้ 0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

a* ถ้ามีค่าเป็นบวกแสดงว่ามีสีค่อนไปทางสีแดง และถ้ามีค่าเป็นลบแสดงว่ามีสีค่อนไปทางสีเขียว

b* ถ้ามีค่าเป็นบวกแสดงว่ามีสีค่อนไปทางสีเหลือง และถ้ามีค่าเป็นลบแสดงว่ามีสีค่อนไปทางสีน้ำเงิน

ทั้งนี้ค่า a* และ b* มีค่าอยู่ระหว่าง -60 ถึง +60

1.14 แผ่นเทียบสี ของบริษัท Minolta

1.15 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrometer) รุ่น Spectronic +20 ของบริษัท Bausch and Lomb

2. สารเคมีและวิธีการเตรียม

2.1 สารละลายเคมีที่ใช้ในการเพิ่มสารอาหารให้ดอกไม้ (Pulsing) มี 4 สูตร ชนิดของสารและวิธีการเตรียมในแต่ละสูตรมีดังนี้

2.1.1 น้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ $AgNO_3$ 150 มก/ ลิตร และกรดซิตริก 30 มก/ลิตร เตรียมโดยการชั่ง น้ำตาลซูโครส 100 กรัม $AgNO_3$ 0.150 กรัม และกรดซิตริก 0.03 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่น

2.1.2 น้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ $AgNO_3$ 150 มก/ ลิตร 8-HQS 400 มก/ลิตร และกรดซิตริก 30 มก/ลิตร เตรียมโดยการชั่ง $AgNO_3$ 0.150 กรัม 8-HQS 0.40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่น และชั่งน้ำตาลซูโครส 100 กรัม และกรดซิตริก 0.03 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่น แล้วนำมาผสมกัน ได้สารละลายที่มีความเข้มข้นที่ต้องการในปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

2.1.3 น้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ 8-HQS 200 มก/ลิตร และ $CoCl_2$ 260 มก/ลิตร เตรียมโดยการชั่งน้ำตาลซูโครส 100 กรัม 8-HQS 0.2 กรัม และ $CoCl_2$ 0.26 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.4 น้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ $Al_2(SO_4)_3$ 150 มก/ลิตร และกรดซิตริก 30 มก/ลิตร เตรียมโดยการชั่งน้ำตาลซูโครส 100 กรัม $Al_2(SO_4)_3$ 0.15 กรัม และกรดซิตริก 0.03 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตรโดยใช้น้ำกลั่น

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการปักแจกัน (Holding) มี 4 สูตร ชนิดของสารและวิธีการเตรียมในแต่ละสูตรมีดังนี้

2.2.1 น้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ $CaCl_2$ 0.4 เปอร์เซ็นต์ และ 8-HQS 200 มก/ลิตร เตรียมโดยการชั่งน้ำตาลซูโครส 50 กรัม $CaCl_2$ 4 กรัม และ 8-HQS 0.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตรโดยใช้น้ำกลั่น

2.2.2 น้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ $AgNO_3$ 50 มก/ลิตร และ8-HQS 200 มก/ลิตร เตรียมโดยการชั่งน้ำตาลซูโครส 50 กรัม $AgNO_3$ 0.05 กรัม และ 8-HQS 0.2 กรัมละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่น

2.2.3 น้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ และ $AgNO_3$ 20 มก/ลิตร เตรียมโดยการชั่งน้ำตาลซูโครส 50 กรัม และ $AgNO_3$ 0.02 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่น

2.2.4 น้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ และ $CoNO_3$ 200 มก/ลิตร เตรียมโดยการชั่งน้ำตาลซูโครส 50 กรัม และ $CoNO_3$ 0.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่น

2.3 สารเคมีที่ใช้ในการหาปริมาณแอนโธไซยานินและวิธีการเตรียม

กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1.5 นอร์มอล เตรียมโดยใช้กรดไฮโดรคลอริกปริมาตร 62.107 มิลลิลิตร เติมลงในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร

เอทธาโนลิกไฮโดรคลอริก (เอทธานอล : กรดไฮโดรคลอริก) ใช้เอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ กรดไฮโดรคลอริก 1.5 นอร์มอล ผสมกันในอัตราส่วน 85 : 15 แล้วเก็บในขวดสีชา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4 สารละลายเคมีที่ใช้ในการหาคลอโรฟิลล์และวิธีการเตรียม

สารละลายอะซิโตน ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยใช้อะซิโตน 800 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่น

3. วัสดุและอุปกรณ์ในการศึกษาเนื้อเยื่อพืชตามวิธี Paraffin embedding

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 ก้านดอกกุหลาบตัดตามขวาง 3 ส่วน คือ บริเวณส่วนโคนก้านดอก บริเวณส่วนกลางก้านดอก และบริเวณส่วนปลายก้านดอก โดยแต่ละส่วนตัดเป็นท่อนสั้นๆ ยาว 2-3 เซนติเมตร

3.1.2 ขวดแก้วสำหรับเก็บตัวอย่างพืช

3.1.3 ขวดแก้วสำหรับย้อมสี (staining jar)

3.1.4 แผ่นสไลด์และกระจกปิดสไลด์ขนาด 22×22 มิลลิเมตร

3.1.5 เครื่องตัดชิ้นส่วนพืชแบบล้อหมุน (rotary microtome)

3.1.6 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.1.7 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (hot air oven)

3.1.8 เครื่องอุ่นแผ่นสไลด์ (slide warmer)

3.1.9 กล้องจุลทรรศน์ติดตั้งกล้องถ่ายภาพ

3.1.10 วัสดุอื่นๆ ได้แก่ พู่กัน มีดผ่าตัด และเข็มเขี่ย

3.2 สารเคมี

3.2.1 absolute alcohol

3.2.2 Delafield' s hematoxylin

3.2.3 น้ำกลั่น

3.2.4 formalin

3.2.5 glacial acetic acid

3.2.6 liquid paraffin

3.2.7 paraffin

3.2.8 permount

3.2.9 tertiary butyl alcohol

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 ผลของสารเคมีสำหรับการทำพัลซิ่งต่อคุณภาพกุหลาบตัดดอก

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) มี 5 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ โดยแต่ละซ้ำใช้กุหลาบพันธุ์ Dallas สีแดง จำนวน 10 ดอก แบ่งออกเป็น 5 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 น้ำกลั่น (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 น้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ $AgNO_3$ 150 มก/ลิตร และกรดซิตริก 30 มก/ลิตร

กรรมวิธีที่ 3 น้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ $AgNO_3$ 150 มก/ลิตร 8-HQS 400 มก/ลิตร และกรดซิตริก 30 มก/ลิตร

กรรมวิธีที่ 4 น้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ 8-HQS 200 มก/ลิตร และ $CoCl_2$ 260 มก/ลิตร

กรรมวิธีที่ 5 น้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ $Al_2(SO_4)_3$ 150 มก/ลิตร และกรดซิตริก 30 มก/ลิตร

วิธีการทดลอง

1. นำกุหลาบพันธุ์ Dallas จากสวนหลังมหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ โดยคัดขนาด คุณภาพ และระยะการพัฒนาของดอกให้ใกล้เคียงและสม่ำเสมอกัน

2. ปลิดใบล่างออกให้เหลือไว้ระดับเหนือน้ำยาเคมีที่ใช้แช่ และตัดโคนก้านดอกออก 2-3 เซนติเมตร โดยตัดเฉียง 45 องศา แล้วแช่ก้านดอกลงในน้ำยาเคมีตามกรรมวิธีต่างๆ ที่เตรียมไว้ข้างต้น ปักไว้ในขวดสำหรับปักแจกันกว้าง 8 เซนติเมตร และสูง 16 เซนติเมตรเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

3. เมื่อครบ 12 ชั่วโมง นำกุหลาบพันธุ์ Dallas ที่ผ่านการทำพัลซิ่งแล้วไปปักแจกันในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้อง

4. บันทึกผลเกี่ยวกับคุณภาพและอายุการปักแจกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การบันทึกผลการทดลอง

1. อายุการปักแจกัน

บันทึกอายุการปักแจกันโดยนับวันที่เริ่มปักแจกันในกรรมวิธีต่างๆ จนถึงวันที่เกิดการโค้งงอของคอดอกและ/หรือการเหี่ยวของดอกมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีหน่วยเป็นวัน

2. อัตราการดูดน้ำ

บันทึกอัตราการดูดน้ำของกุหลาบระหว่างการปักแจกัน โดยวัดปริมาณน้ำที่ดอกกุหลาบดูดไปใช้แต่ละวันต่อดอก มีหน่วยเป็น มล/ดอก/วัน

3. น้ำหนักสดของกุหลาบ

บันทึกน้ำหนักสดของกุหลาบตั้งแต่เริ่มปักแจกันจนกระทั่งหมดอายุการปักแจกัน โดยให้น้ำหนักสดของดอกกุหลาบเริ่มต้น ในแต่ละกรรมวิธีเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์น้ำหนักสดโดย

$$\text{เปอร์เซ็นต์น้ำหนักสด} = \frac{\text{น้ำหนักดอกหลังปักแจกัน}}{\text{น้ำหนักดอกก่อนปักแจกัน}} \times 100$$

4. สีของใบและกลีบดอกกุหลาบ

วัดสีของใบและกลีบดอกกุหลาบ โดยใช้เครื่องวัดสี Chromameter โดยสุ่มตัวอย่างกลีบดอกจำนวน 15 กลีบ บันทึกค่าในระบบ CIELAB (L* ,a* ,b*) แล้วคำนวณหาค่า Chroma และ hue angle จากสมการดังนี้

$$\text{Chroma} = (a^* + b^*)^{1/2}$$

$$\text{Hue angle} = \text{arctangent} \frac{(a^*)}{b^*}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การหาปริมาณแอนโธไซยานินของกลีบดอกกุหลาบ

นำกลีบดอกกุหลาบพันธุ์ Dallas สีแดงจำนวน 0.5 กรัมมาหั่นให้ละเอียด จากนั้นเติม ethanolic HCl ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วในไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน เมื่อครบ 1 คืนแล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 แล้วปรับปริมาตรด้วย ethanolic HCl ให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย ethanolic HCl เป็น Blank แล้วนำค่า OD ที่ได้ไปแทนค่าในสูตรหาปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมด มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม/100 กรัม น้ำหนักสด โดยสูตรที่ใช้ในการคำนวณมีดังต่อไปนี้

$$\text{Total absorbance} = \frac{\text{OD } 535 \times V \times 100}{W}$$

$$\text{Total anthocyanin content} = \frac{\text{Total absorbance}}{98.2}$$

โดยที่ V = ปริมาตรของสารละลายที่นำมาหาปริมาณแอนโธไซยานิน

W = น้ำหนักของกลีบดอกกุหลาบที่นำมาปริมาณแอนโธไซยานิน

OD = ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากเครื่องสเปคโตรนิค +20 ตามความยาวคลื่นที่กำหนด

6. การหาปริมาณคลอโรฟิลล์ของใบกุหลาบ

นำใบกุหลาบพันธุ์ Dallas สีแดงจำนวน 1 กรัม มาบดในโกร่งบด ขณะบดเติมอะซีโตน 80 เปอร์เซ็นต์ลงไปเล็กน้อย จากนั้นบดจนละเอียด แล้วนำมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 จากนั้นนำไปปรับปริมาตรด้วยอะซีโตนให้ได้ปริมาตร 20 มิลลิลิตรโดยใช้กระบอกตวง นำสารละลายที่กรองได้แล้วไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร บันทึกค่าที่ได้แล้วนำไปคำนวณตามสูตร มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม /100 กรัม น้ำหนักสด โดยสูตรที่ใช้ในการคำนวณมีดังต่อไปนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

$$\text{Chlorophyll a} = [12.7 (OD\ 663) - 2.69 (OD\ 645)] \times \frac{V}{1{,}000 \times W}$$

$$\text{Chlorophyll b} = [22.9 (OD\ 645) - 4.68 (OD\ 663)] \times \frac{V}{1{,}000 \times W}$$

$$\text{Total Chlorophyll} = [20.2 (OD\ 645) - 8.02 (OD\ 663)] \times \frac{V}{1{,}000 \times W}$$

โดยที่ V = ปริมาตรของสารละลายที่นำมาหาปริมาณแอนโธไซยานิน

W = น้ำหนักของกลีบดอกกุหลาบที่นำมาหาปริมาณแอนโธไซยานิน

OD = ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากเครื่องสเปคโตรนิค +20 ตามความยาวคลื่นที่กำหนด

7. การบานของดอก บันทึกการบานของดอกโดยการให้คะแนนดังนี้

0 = ดอกบาน 0-25 เปอร์เซ็นต์

1 = ดอกบาน 26-50 เปอร์เซ็นต์

3 = ดอกบาน 51-75 เปอร์เซ็นต์

5 = ดอกบาน 76-100 เปอร์เซ็นต์

8. การโค้งงอของคอดอก บันทึกการโค้งงอของคอดอก โดยการให้คะแนนดังนี้

0 = คอดอกโค้งงอ 0-25 เปอร์เซ็นต์

1 = คอดอกโค้งงอ 26-50 เปอร์เซ็นต์

3 = คอดอกโค้งงอ 51-75 เปอร์เซ็นต์

5 = คอดอกโค้งงอ 76-100 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

9. ความเหี่ยวของดอก บันทึกความเหี่ยวของดอก โดยการให้คะแนนดังนี้

   0 = ดอกสดมาก

   1 = ดอกเหี่ยวเล็กน้อย

   3 = ดอกเหี่ยวปานกลาง

   5 = ดอกเหี่ยวมาก

10. ความเหี่ยวของใบ บันทึกความเหี่ยวของใบ โดยการให้คะแนนดังนี้

   0 = ใบไม่เหลือง และไม่เหี่ยว

   1 = ใบเหลือง และเหี่ยวเล็กน้อย

   3 = ใบเหลือง และเหี่ยวปานกลาง

   5 = ใบเหลือง และเหี่ยวมาก

11. สีน้ำเงินปนม่วง (blueing) บันทึกการเกิดสีน้ำเงินปนม่วงบนกลีบดอก โดยการให้คะแนนดังนี้

   0 = กลีบดอกไม่การเปลี่ยนสี

   1 = กลีบดอกเปลี่ยนสีเล็กน้อย

   3 = กลีบดอกเปลี่ยนสีปานกลาง

   5 = กลีบดอกเปลี่ยนสีมาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 ผลของสารเคมีสำหรับการปักแจกันต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพกุหลาบตัดดอก

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) มี 5 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ โดยแต่ละซ้ำใช้กุหลาบพันธุ์ Dallas สีแดง จำนวน 10 ดอก แบ่งออกเป็น 5 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 น้ำกลั่น (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 น้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ $CaCl_2$ 0.4 เปอร์เซ็นต์ และ 8-HQS 200 มก/ลิตร

กรรมวิธีที่ 3 น้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ $AgNO_3$ 50 มก/ลิตร และ 8-HQS 200 มก/ลิตร

กรรมวิธีที่ 4 น้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ และ$AgNO_3$ 20 มก/ลิตร

กรรมวิธีที่ 5 น้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ และ $CoNO_3$ 200 มก/ลิตร

วิธีการทดลอง

1. นำกุหลาบพันธุ์ Dallas มาคัดขนาดและคุณภาพให้ใกล้เคียงกัน
2. ปลิดใบล่างออกให้เหลือไว้ระดับเหนือสารเคมีที่ใช้แช่ และตัดโคนก้านดอกออก 2-3 เซนติเมตร โดยตัดเฉียง 45 องศา แล้วแช่ก้านดอกลงในน้ำยาเคมีตามกรรมวิธีต่างๆ ที่เตรียมไว้ข้างต้น โดยแช่ในขวดสำหรับปักแจกันกว้าง 8 เซนติเมตร และสูง 16 เซนติเมตรตลอดอายุการปักแจกัน
3. บันทึกผลเกี่ยวกับคุณภาพและอายุการปักแจกันเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 3 ผลของอุณหภูมิร่วมกับสารเคมีสำหรับปักแจกันต่อคุณภาพกุหลาบตัดดอก

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) มี 5 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ โดยแต่ละซ้ำใช้กุหลาบพันธุ์ Dallas จำนวน 10 ดอก

นำสูตรสารเคมีที่ให้ผลดีที่สุดในการทดลองที่ 1 คือกรรมวิธีที่ 3 ที่ประกอบด้วย น้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ $AgNO_3$ 150 มก/ลิตร 8-HQS 400 มก/ลิตร และกรดซิตริก 30 มก/ลิตร มาทำพัลซิ่งกุหลาบพันธุ์ Dallas สีแดง แล้วนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 หรือ 5 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำมาปักแจกันโดยใช้สูตรสารละลายเคมีที่ให้ผลดีที่สุดของการทดลองที่ 2 คือกรรมวิธีที่ 2 ซึ่งประกอบด้วย น้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ $CaCl_2$ 0.4 เปอร์เซ็นต์ และ 8-HQS 200 มก/ลิตร แบ่งออกเป็น 4 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ทำพัลซิ่งแล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำไปปักแจกันในน้ำกลั่น

กรรมวิธีที่ 2 ทำพัลซิ่งแล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำไปปักแจกันใน สารเคมี

กรรมวิธีที่ 3 ทำพัลซิ่งแล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำไปปักแจกันในน้ำกลั่น

กรรมวิธีที่ 4 ทำพัลซิ่งแล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำไปปักแจกันในสารเคมี

วิธีการทดลอง

1. นำกุหลาบพันธุ์ Dallas สีแดง มาคัดขนาดและคุณภาพให้ใกล้เคียงกัน
2. ปลิดใบล่างออกให้เหลือไว้ระดับเหนือสารเคมีที่ใช้แช่ และตัดโคนก้านดอกออก 2-3 เซนติเมตร โดยตัดเฉียง 45 องศา แล้วแช่ก้านดอกลงในสารละลายที่ประกอบไปด้วยน้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ $AgNO_3$ 150 มก/ลิตร 8-HQS 400 มก/ลิตร และกรดซิตริก 30 มก/ลิตร โดยปักไว้ในขวดสำหรับปักแจกันกว้าง 8 เซนติเมตร และสูง 16 เซนติเมตรเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3. นำกุหลาบพันธุ์ Dallas มาห่อด้วยกระดาษปรู้ฟแล้วบรรจุลงในกล่องกระดาษที่มีรูระบายอากาศและบรรจุตัวดูดซับเอทธิลีนลงไปในกล่อง จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 หรือ 5 องศาเซลเซียส

4. นำกุหลาบพันธุ์ Dallas ที่เก็บรักษาเป็นเวลา 3, 6, 9 และ 12 วัน มาตัดโคนก้านดอกออก 2-3 เซนติเมตร แล้วนำมาแช่ในสารละลายที่ประกอบด้วย น้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ $CaCl_2$ 0.4 เปอร์เซ็นต์ และ 8-HQS 200 มก/ลิตร โดยปักไว้ในขวดสำหรับปักแจกันกว้าง 8 เซนติเมตร และสูง 16 เซนติเมตร จนหมดอายุการปักแจกัน

5. บันทึกการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 และ 2

การทดลองที่ 4 ผลของสารเคมีต่อปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำปักแจกัน

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) มี 4 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 2 ซ้ำ โดยหาปริมาณจุลินทรีย์ในกรรมวิธีต่างๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 น้ำกลั่น (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 ทำพัลซิ่งในสารเคมีที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ $AgNO_3$ 150 มก/ลิตร 8-HQS 400 มก/ลิตร และกรดซิตริก 30 มก/ลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปักแจกันในน้ำกลั่น

กรรมวิธีที่ 3 ปักแจกันในสารเคมีที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ $CaCl_2$ 0.4 เปอร์เซ็นต์ และ 8-HQS 200 มก/ลิตร

กรรมวิธีที่ 4 ทำพัลซิ่งในสารเคมีที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ $AgNO_3$ 150 มก/ลิตร 8-HQS 400 มก/ลิตร และกรดซิตริก 30 มก/ลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปักแจกันในสารเคมีที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ $CaCl_2$ 0.4 เปอร์เซ็นต์ และ 8-HQS 200 มก/ลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยทำการหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์พร้อมกันทุกกรรมวิธีในวันที่ชุดควบคุมหมดอายุการปักแจกัน ซึ่งมีวิธีการทดลองดังต่อไปนี้

1. เตรียมอาหาร โดยการนำ nutrient Agar ซึ่งประกอบด้วย gelatin peptone 5 กรัม beef extract 3 กรัม และ bacteroilogical agar 15 กรัม มาผสมกับน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

จากนั้นคนให้เข้ากันและทิ้งไว้จนกระทั่งเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นค่อยๆ ให้ความร้อนจนเดือดเป็นเวลา 1-2 นาทีหรือจนกระทั่งสารละลายอิ่มตัว นำมาแบ่งใส่ขวดและทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

2. นำน้ำที่ใช้ในการปักแจกันในแต่ละกรรมวิธีมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น จนได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5}

3. ดูดตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

4. เทอาหาร plate count agar ที่หลอมเหลวแล้ว ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 10-15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว

5. นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

6. นับจำนวนโคโลนีในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี แล้วนำมาคำนวณหาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดต่อปริมาณน้ำปักแจกัน 1 มิลลิลิตร โดยสูตรที่ใช้ในการคำนวณ คือ

$$\text{จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำปักแจกัน} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีที่นับได้}}{\text{ระดับความเข้มข้นของน้ำที่ใช้ในการปักแจกัน}}$$

การทดลองที่ 5 การศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อท่อลำเลียงน้ำภายในก้านดอกกุหลาบ

การเปรียบเทียบลักษณะเนื้อเยื่อท่อลำเลียงน้ำภายในก้านดอกกุหลาบในกรรมวิธีควบคุม (น้ำกลั่น) และกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีโดยทำการพัลซิ่งด้วยสารเคมีที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ $AgNO_3$ 150 มก/ลิตร 8-HQS 400 มก/ลิตร และกรดซิตริก 30 มก/ลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมงหลังจากนั้นนำมาปักแจกันในสารเคมีที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ $CaCl_2$ 0.4 เปอร์เซ็นต์ และ 8-HQS 200 มก/ลิตร โดยเปรียบเทียบกับก่อนทำการปักแจกัน โดยนำก้านดอกมาศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อท่อลำเลียงน้ำในวันที่ชุดควบคุมหมดอายุการปักแจกัน โดยศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อท่อลำเลียงน้ำ 3 ส่วน คือ บริเวณส่วนโคนก้านดอก บริเวณส่วนกลางก้านดอก และบริเวณส่วนปลายก้านดอกหรือคอดอก ตามวิธีการทำสไลด์ถาวรเนื้อเยื่อพืชโดยการฝังพาราฟิน (paraffin embedding method) ตามเทคนิคของ Johansen (1940) ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1. การรักษาสภาพเซลล์

นำชิ้นส่วนของพืชใส่ในน้ำยารักษาสภาพของเซลล์ (fixative) เพื่อฆ่าเซลล์และรักษาสภาพเซลล์ และเก็บรักษาเนื้อเยื่อไว้ในสภาพที่ใกล้เคียงเซลล์ปกติ

น้ำยาที่ใช้ในขั้นตอน fixative คือน้ำยา FAA หรือ Formalin-Acetic acid Alcohol ซึ่งมีส่วนผสมดังต่อไปนี้

50 % หรือ 70 % ethyl alcohol	90	มิลลิลิตร
glacial acetic acid	5	มิลลิลิตร
formalin	5	มิลลิลิตร
หรือ		
95 % ethyl alcohol	50	มิลลิลิตร
glacial acetic acid	5	มิลลิลิตร
formalin	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	35	มิลลิลิตร

แช่เนื้อเยื่อไว้นานประมาณ 18-24 ชั่วโมง หรือนานกว่านี้

2. การดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydration)

นำเนื้อเยื่อจากข้อ 1 มาผ่านน้ำยาดึงน้ำออกจากเซลล์ตามขั้นตอนโดยที่แต่ละขั้นตอนเป็นน้ำยาที่มีความเข้มข้นของ alcohol เพิ่มจาก 50% เป็น 100%

เตรียมน้ำยา dehydration สำหรับแต่ละขั้นตอนตามสูตรดังนี้

ขั้นตอน	50%	70%	85%	95%	100% (alcohol)
น้ำกลั่น	50	30	15	-	-
95 % ethyl alcohol	40	50	50	45	-
TBA	10	20	35	55	75
absolute alcohol	-	-	-	-	25

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อผ่านน้ำยาในขั้นตอนที่ 5 แล้ว น้ำเนื้อเยื่อไปผ่าน TBA (100%) อีก 3 ครั้ง ก่อนน้ำเนื้อเยื่อที่ผ่านการดึงน้ำออกหมดแล้วไปสู่ขั้นตอนถัดไป

3. การแทนที่ alcohol ด้วย paraffin (Infiltration)

นำเนื้อเยื่อจากขั้นตอนที่ 2 ไปผ่าน TBA + liquid paraffin ในอัตราส่วน 1 : 1 นำไปไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 58-60 องศาเซลเซียส โดยเริ่มอบจากพาราฟินเกรดต่ำแล้วเปลี่ยนเป็นพาราฟินเกรดสูงตามลำดับ โดยในการเปลี่ยนครั้งสุดท้ายนั้นใช้พาราฟินบริสุทธิ์ซึ่งมีชื่อการค้าคือ Paraplast ทิ้งเนื้อเยื่อไว้ในตู้อบนาน 1 สัปดาห์เป็นอย่างต่ำก่อนที่จะดำเนินการในขั้นตอนต่อไป

4. การฝังชิ้นส่วนในพาราฟิน (embedding)

นำเนื้อเยื่อจากข้อ 3 มาฝังในพาราฟินที่หลอมไว้ในแม่พิมพ์ก่อนที่พาราฟินจะแข็งตัว พร้อมกับจัดตำแหน่งของเนื้อเยื่อให้อยู่ในระนาบที่สามารถนำไปตัดได้ตามวัตถุประสงค์พร้อมทั้งไล่ฟองอากาศที่อยู่บริเวณชิ้นส่วนเนื้อเยื่อออกให้หมดแล้วปล่อยให้พาราฟินแข็งตัว

5. การตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ (Sectioning)

ตัดเนื้อเยื่อด้วยไมโครโตมชนิดล้อหมุนให้เนื้อเยื่อมีความหนา 10-15 ไมครอน โดยการนำเนื้อเยื่อในพาราฟินจากข้อ 4 ไปติดกับแท่งไม้สี่เหลี่ยมที่มีขนาด 1.5 x1.5x1.5 ลบ.ซม.ไปใส่บนเครื่องตัดแล้วตัดเนื้อเยื่อโดยใช้มือหมุนให้ได้แผ่น ribbon ในลักษณะตรง และมีความยาวต่อเนื่องไม่ฉีกขาด เลือกเอาบริเวณที่ต้องการไปวางบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. การยึดแผ่น ribbon กับแผ่นสไลด์ (Mounting)

ยึด ribbon ให้ติดกับแผ่นสไลด์โดยใช้น้ำยายึดที่เตรียมโดยการตีไข่ขาวจนข้น ตักเอาฟองอากาศออกให้หมด นำไข่ขาวมาผสมกับน้ำในอัตราส่วน 1 : 50 แล้วผสมสารละลายดังกล่าว 100 มิลลิลิตรกับ sodium benzoate 0.5-1 กรัม หยดน้ำยายึดลงบนแผ่นสไลด์ที่วางบนแผ่นให้ความร้อนที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พอน้ำยาแห้งหมาดๆ นำแผ่น ribbon ที่แบ่งเป็นชิ้นสั้นๆ นำมา

วางลงไปโดยเรียงตามลำดับของ ribbon จากนั้นทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 24 ชั่วโมง หรือประมาณ 2-3 วันจึงนำแผ่นสไลด์ไปผ่านขั้นตอนของการย้อมสีเนื้อเยื่อ

7. การย้อมสีเนื้อเยื่อ

ย้อมสีเนื้อเยื่อในสารละลายสี Dalafield' s hematoxylin โดยการนำสไลด์ที่ติด ribbon แล้วไปละลายเอาพาราฟินออกในไซลีน จากนั้นจึงนำไปย้อมสีโดยผ่านไปตามขั้นตอน จากนั้นจึงปิดเนื้อเยื่อด้วยแผ่นปิดสไลด์

8. การปิดแผ่นปิดสไลด์

ปิดแผ่นสไลด์โดยใช้ Canada balsam เป็นตัวเชื่อม หยดสารตัวเชื่อมบนแผ่นสไลด์ 1-2 หยด วางแผ่นปิดสไลด์ลงไป ไล่ฟองอากาศด้วยเข็มเขี่ย นำไปวางไว้ในที่ที่ปราศจากฝุ่น หรือเก็บในตู้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้จนแห้งสนิท แล้วนำไปเก็บไว้ในกล่องเก็บสไลด์เพื่อรอการตรวจเนื้อเยื่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สถานที่ที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการหลังการเก็บเกี่ยวพืชสวน และห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาทำการทดลอง

เริ่มต้น เมษายน 2547

สิ้นสุด ธันวาคม 2548

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved