บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองนี้เป็นการศึกษาการเจริญเติบโตของซ่อนกลิ่น โดยศึกษาการเจริญเติบโตของต้นพืชทดลองตลอดวงจรการเจริญเติบโต เพื่อบันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตทางใบและดอกของพืชทดลองจากหัวพันธุ์ 3 ขนาด คือ A , B และ C ซึ่งเป็นหัวที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางหัว 3.1-4.0 , 2.1-3.0 และ 1.1-2.0 ซม ตามลำดับ หัวพันธุ์ซ่อนกลิ่นที่ใช้ทดลองได้จากศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

การทดลองแบ่งออกเป็นการทดลองย่อยดังนี้

1. การทดลองที่ 1 วงจรการเจริญเติบโต

1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.1.1 ถุงเพาะชำสีดำขนาด 4x6 นิ้ว

1.1.2 วัสดุปลูก ได้แก่ ดิน:ขี้เถ้าแกลบ:เปลือกถั่ว ในอัตราส่วน 2:1:1

1.1.3 หัวพันธุ์ซ่อนกลิ่นขนาด B

1.2 วิธีการทดลอง

ศึกษาวงจรการเจริญเติบโตของพืชทดลองโดยการติดตามและบันทึกการเจริญเติบโตของต้นพืชทดลองตั้งแต่เริ่มการเจริญเติบโตจากหัวที่หมดระยะพักตัวแล้วจนกระทั่งถึงช่วงที่หัวใหม่เข้าระยะพักตัวและหมดระยะพักตัวซึ่งเป็นอันครบวงจร เพื่อที่จะทราบช่วงเวลาที่จะมีการสร้างใบ ดอก และหัวใหม่

2. การทดลองที่ 2 การสร้างดอก

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1 ขวดสำหรับใส่น้ำยาเคมีและเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อพืช

2.1.2 ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ระดับอุณหภูมิ 56 °ซ

2.1.3 เครื่องตัดเนื้อเยื่อพืชแบบล้อหมุน (rotary microtome)

2.1.4 แท่งไม้ขนาด 1.5 x 1.5 x 1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร (ลบ.ซม)

2.1.5 แผ่นสไลด์และแผ่นปิดสไลด์

2.1.6 แผ่นให้ความร้อนสำหรับอุ่นสไลด์ (hot plate)

2.1.7 ขวดแก้วสำหรับย้อมสีเนื้อเยื่อ

2.1.8 กล้องจุลทรรศน์และอุปกรณ์ถ่ายภาพ

2.1.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์ เข็มเขี่ยและมีดผ่าตัด

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมชิ้นส่วนพืชและสไลด์ถาวร (Johansen, 1940)

2.2.1 น้ำยาสำหรับฆ่าและรักษาสภาพเซลล์ (killing and fixing solution) คือ น้ำยา FAA (formalin-acetic acid-alcohol) ซึ่งประกอบด้วยสารเคมีในอัตราส่วนดังต่อไปนี้

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

2.2.2 น้ำยาสำหรับดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution) ซึ่งมีส่วนผสมของ ethyl alcohol 95% , absolute alcohol , tertiary butyl alcohol (TBA) และน้ำกลั่นในอัตราส่วนต่างกัน ตั้งแต่ระดับ 50 % ของน้ำยาไปจนถึง 100 % ของน้ำยา ดังแสดงส่วนผสมและอัตราส่วนของสารเคมีดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ส่วนผสมและอัตราส่วนของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้สำหรับดึงน้ำออกจากเซลล์

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

* ผสมสี erythrosin

2.2.3 สารตัวกลางที่ใช้สำหรับฝังเนื้อเยื่อเพื่อการตัด (embedding media) ได้แก่ Paraplast

2.2.4 xylene

2.2.5 น้ำยายึดเนื้อเยื่อให้ติดบนแผ่นสไลด์ (adhesive) ซึ่งเตรียมได้ดังนี้

ไข่ขาว	1	มล
น้ำกลั่น	49	มล

เมื่อจะนำไปใช้ให้ผสมน้ำยา 1 มลต่อน้ำกลั่น 50 มล

2.2.6 สีสังเคราะห์สำหรับย้อมเนื้อเยื่อ คือ Dalafield's hematoxylin ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมดังนี้

ammonium aluminium sulfate	400	มล
hematoxylin	4	มล
95% ethyl alcohol	25	มล
methyl alcohol	100	มล
glycerol	100	มล

2.2.7 สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นสไลด์ ได้แก่ Canada balsam (Merck)

2.3 วิธีการทดลอง

การศึกษาการสร้างและการเจริญเติบโตของดอกเป็นการติดตามการเกิดและการเจริญของดอก โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของตาที่ตำแหน่งต่าง ๆ ของหัวในช่วงต่าง ๆ ของวงจรการเจริญเติบโต นำส่วนดังกล่าวมาศึกษาเนื้อเยื่อเพื่อติดตามการเกิดและการเจริญของดอกและช่อดอก โดยเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากต้นที่เจริญเติบโตจากหัวทุกขนาดสัปดาห์ละ 5 ต้น จากวันที่เริ่มปลูกจนกระทั่งระยะดอกบาน

การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา ใช้เทคนิค paraffin embedding ตามวิธีการของ Johansen (1940) โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.3.1 การเก็บตัวอย่าง นำส่วนปลายยอด ตาข้าง ตาดอกและดอกช่อนกลิ่นมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ

2.3.2 การฆ่าและรักษาสภาพเนื้อเยื่อ นำชิ้นส่วนพืชจากข้อ 2.3.1 แช่ในน้ำยา FAA ให้ท่วมชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืช ทิ้งเนื้อเยื่อไว้ในน้ำยาอย่างน้อย 1 สัปดาห์

2.3.3 การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ นำชิ้นส่วนพืชจากข้อ 2.3.2 แช่ในน้ำยาสำหรับดึงน้ำออกจากเซลล์โดยผ่านเนื้อเยื่อลงในน้ำยาจากระดับที่ 1 ถึงระดับที่ 5 ตามด้วย TBA บริสุทธิ์ และ TBA ผสมกับพาราฟินเหลว (1:1) ตามลำดับ โดยแต่ละระดับใช้ระยะเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง หลัง

จากนั้นผ่านเนื้อเยื่อลงใน Paraplast ซึ่งหลอมไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 56°ซ และทิ้งเนื้อเยื่อไว้ในขวดที่บรรจุพาราฟินดังกล่าวไว้ในตู้อบอย่างน้อย 1 สัปดาห์

2.3.4 การฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน ใช้กระดาษพับเป็นกระทงแล้วเท Paraplast ที่หลอมไว้ที่อุณหภูมิ 56°ซ มาแล้วไม่ต่ำกว่า 24 ชั่วโมงลงไปจนเกือบเต็มกระทง รอจนส่วนล่างของ Paraplast เย็นตัวจึงใช้เข็มเขี่ยลนไฟจนร้อนปาดผิวหน้า Paraplast ให้เหลว แล้วนำเนื้อเยื่อพืชจากข้อ 2.3.3 ใส่ลงไปจัดให้อยู่ในแนวที่ต้องการ ทิ้งให้เย็นตัว จากนั้นจึงนำมาตัดเป็นแท่งสี่เหลี่ยมตามลักษณะของเนื้อเยื่อ

2.3.5 การตัดเนื้อเยื่อด้วย rotary microtome นำชิ้นส่วนพืชที่ฝังใน Paraplast แล้วมาติดบนแท่งไม้ นำเนื้อเยื่อไปตัดให้มีความหนา 10-15 ไมครอน เมื่อได้แถบชิ้นส่วนพืช (ribbon) มาแล้วเลือกส่วนที่สมบูรณ์ที่สุด โดยตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์

2.3.6 นำแถบชิ้นส่วนพืชที่ได้ติดลงบนแผ่นสไลด์โดยหยดน้ำยา adhesive ลงบนแผ่นสไลด์ ใช้พู่กันเกลี่ยและวางแถบเนื้อเยื่อลงไป นำแผ่นสไลด์ไปวางบนแผ่นความให้ร้อนสำหรับอุ่นแผ่นสไลด์เป็นเวลา 3-4 วันเพื่อให้แถบชิ้นส่วนแห้งและติดแน่นบนแผ่นสไลด์ก่อนการย้อมสี

2.3.7 ขั้นตอนการย้อมสี ใช้เวลาย้อมในแต่ละขั้นตอน 3-5 นาที โดยผ่านแผ่นสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อพืชติดอยู่ผ่านน้ำยาต่าง ๆ ตามขั้นตอนดังนี้

2.3.7.1 xylene

2.3.7.2 xylene + ethyl alcohol 95 % ในอัตราส่วน 1:1

2.3.7.3 xylene + ethyl alcohol 95 % ในอัตราส่วน 1:1

2.3.7.4 ethyl alcohol 95%

2.3.7.5 ethyl alcohol 70%

2.3.7.6 ethyl alcohol 50%

2.3.7.7 ethyl alcohol 30%

2.3.7.8 สี hematoxylin

2.3.7.9 น้ำประปา

2.3.7.10 ethyl alcohol 30%

2.3.7.11 ethyl alcohol 50%

2.3.7.12 ethyl alcohol 70%

2.3.7.13 ethyl alcohol 95%

2.3.7.14 ethyl alcohol 100% + xylene ในอัตราส่วน 1:1

2.3.7.15 ethyl alcohol 100% + xylene ในอัตราส่วน 1:1

2.3.7.16 ethyl alcohol 100%

2.3.8 ปิดแผ่นสไลด์ด้วยแผ่นปิดสไลด์หลังจากสีย้อมแห้งแล้วโดยใช้ Canada balsam เป็นสารยึดสไลด์ถาวร

2.3.9 นำแผ่นสไลด์ที่ได้ไปศึกษาและถ่ายรูปใต้กล้องจุลทรรศน์

3. การทดลองที่ 3 ผลของขนาดหัวที่มีต่อการเจริญเติบโต

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 หัวซ่อนกลิ่นขนาด A , B และ C

3.1.2 เวอร์เนียคาลิปเปอร์

3.1.3 สายวัด

3.2 วิธีการทดลอง

สุ่มตัวอย่างต้นซ่อนกลิ่นซึ่งเจริญเติบโตจากหัวพันธุ์ทั้งสามขนาด ๆ ละ 20 ต้น บันทึกข้อมูลเกี่ยวกับการเจริญเติบโตดังนี้

3.2.1 การเจริญเติบโตทางใบ บันทึกข้อมูลในแง่ของจำนวนวันนับจากปลูกจนถึงวันที่หัวงอก จำนวนใบต่อต้น ความสูงของต้น จำนวนวันนับจากปลูกจนถึงต้นตาย และ ผลผลิตของหัวใหม่

3.2.2 การเจริญเติบโตทางดอก บันทึกข้อมูลในแง่ของจำนวนวันนับจากปลูกจนถึงวันออกดอกและวันที่เก็บเกี่ยวดอก ผลผลิตของดอกทั้งปริมาณและคุณภาพ ตลอดจนคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวของดอก

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design ; CRD)

4. การทดลองที่ 4 ผลของขนาดหัวและสารละลายน้ำตาลที่มีต่อการปรับปรุงการบานของดอกในแจกัน

4.1 วัสดุและอุปกรณ์

4.1.1 ขวดแก้วขนาด 800 มล

4.1.2 มีดและกรรไกรตัดกิ่ง

4.1.3 สายวัด

4.1.4 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

4.1.5 บีกเกอร์ขนาด 1,000 มล

4.2 สารเคมี

4.2.1 น้ำตาลทรายขาว

4.2.2 8-HQS

4.2.3 กรดซิตริก (citric acid)

4.2.4 น้ำกลั่น

4.3 วิธีการทดลอง

การทดลองนี้เป็นการศึกษาผลของขนาดของช่อดอกและความเข้มข้นของน้ำตาลในสารละลายที่ใช้ยืดอายุการปักแจกันที่มีต่อการบานของดอกในแจกัน โดยใช้ช่อดอกซึ่งเก็บเกี่ยวจากต้นที่เจริญเติบโตจากหัวที่มีขนาดแตกต่างกัน 3 ขนาด คือ A , B และ C (ดังกล่าวไว้ในข้อ 1.1.3) ตามลำดับ และความเข้มข้นของน้ำตาล (S) คือ 0 , 2 , 5 และ 10 % ในน้ำยาที่มีส่วนผสมของ 8-HQS 250 สตล และกรดซิตริก 250 สตล วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) โดยมีกรรมวิธีการทดลองเป็น 3 x 4 แต่ละกรรมวิธีมี 6 ซ้ำ วิธีการทดลองมีดังนี้

4.3.1 เตรียมสารละลายปักแจกันดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 อัตราส่วนของสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารละลายปักแจกันในแต่ละกรรมวิธี

สารเคมี / กรรมวิธี	น้ำตาลทราย (กรัม)	8-HQS (มก)	กรดซิตริก (มก)	น้ำกลั่น (มล)
S0	-	2.5	2.5	1,000
S2	20	2.5	2.5	1,000
S5	50	2.5	2.5	1,000
S10	100	2.5	2.5	1,000

4.3.2 เก็บเกี่ยวดอกช่อนกลิ่นโดยใช้กรรไกรตัดกิ่งตัดก้านช่อดอกบริเวณชิดโคนหัว จากนั้นนำมาตัดโคนก้านช่อดอกออกโดยใช้มีดตัดก้านในน้ำเพื่อให้ช่อดอกทุกช่อมีความยาวก้านเท่ากัน คือ 50 ซม

4.3.3 ปักช่อดอกลงในขวดแก้วที่บรรจุสารละลายที่ใช้ยืดอายุการปักแจกันในกรรมวิธีต่าง ๆ ดังข้อ 4.3.1

4.3.4 บันทึกอายุการปักแจกันของช่อดอกช่อนกลิ่นในแต่ละกรรมวิธี

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University