บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 การปรับปรุงพันธุ์คาร์เนชั่น

1.1 การผสมพันธุ์

วัสดุและอุปกรณ์

1. คาร์เนชั่น 2 กลุ่ม

1.1 กลุ่มดอกเดี่ยว (Standard) 5 สายพันธุ์ ได้แก่ Leopardi (แดง), Omeggio (ชมพู), Sahara (เหลือง), Casper (ขาว) และ RPF- CAR-2 (ส้ม) (ภาพ 2)

1.2 กลุ่มดอกช่อ (Spray) 10 สายพันธุ์ ได้แก่ Poker (แดง), Lior (เหลือง), White Ashley (ขาว), Splendid (ชมพูอ่อน), Sampride (ชมพู), RPF-CAR-1 (ชมพูอ่อนขลิบชมพูเข้ม), RPF-CAR-3 (แดงเลือดนกขอบหยัก), RPF-CAR-4 (บานเย็นขอบหยัก), RPF-CAR-5 (ม่วงเข้มขอบหยัก) และ RPF-CAR-6 (ขาวขอบหยัก) (ภาพ 3)

1.2 รูปแบบการผสมพันธุ์

1.2.1 การผสมตัวเอง

1.2.1.1 กลุ่มดอกเดี่ยว

1.2.1.2 กลุ่มดอกช่อ

1.2.2 การผสมข้าม

1.2.2.1 ภายในกลุ่มดอกเดี่ยว

1.2.2.2 ภายในกลุ่มดอกช่อ

1.2.2.3 ระหว่างกลุ่มดอกเดี่ยวและกลุ่มดอกช่อ

1.3 วิธีการผสมพันธุ์

1.3.1 การเตรียมดอกที่ใช้เป็นดอกเพศเมีย เลือกดอกที่อยู่ในระยะบานได้ครึ่งหนึ่ง โดยใช้มีดตัดส่วนของกลีบรองดอกออก ประมาณ 1 ใน 4 ส่วนของกลีบรองดอก และใช้คีมคีบ ดึงกลีบตรงกลาง และเกสรเพศผู้ออก ปล่อยกลีบแถวนอกเพื่อป้องกันเกสรเพศเมีย และรังไข่จนกระทั่งเกิดฝัก

1.3.2 เมื่อเกสรเพศเมียยื่นออกมาและเริ่มมีขนเกิดขึ้นแสดงว่าดอกพร้อมที่จะได้รับการผสมเกสร นำเกสรเพศผู้ของต้นที่จะนำมาผสมมาป้ายที่เกสรเพศเมียโดยดอกคาร์เนชั่นพร้อมที่จะได้รับการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผสมเวลา 8:00 - 10:00 น. หลังการผสมคลุมดอกที่ได้การผสมด้วยถุงผ้ารีเมย์ ติดป้ายบันทึกคู่ผสม และวันที่ทำการผสม

1.3.3 นำเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ได้จากการผสมเกสรของแต่ละคู่ผสมไปเพาะ และทำการปลูกทดสอบเพื่อทำการคัดเลือกสายต้นครั้งที่ 1

1.3.4 ภายหลังการคัดเลือกต้นครั้งที่ 1 ได้จำนวนต้น 94 หมายเลข แล้วทำการคัดเลือกซ้ำจากลูกผสม 94 หมายเลข อีกเป็นครั้งที่ 2 และนำต้นที่ได้จากการคัดเลือกครั้งที่ 2 ไป ขยายพันธุ์เพื่อปลูกทดสอบลักษณะลูกผสมอีกครั้ง

ภาพ 2 คาร์เนชั่นกลุ่มดอกเดี่ยว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Poker

Splendid

Lior

White Ashley

Sampride

RPF-CAR-1

RPF-CAR-3

RPF-CAR-4

RPF-CAR-5

RPF-CAR-6

ภาพ 3 คาร์เนชั่นกลุ่มดอกช่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง พ่อแม่และลูกผสมโดยวิธีการวิเคราะห์ไอโซไซม์

ศึกษารูปแบบไอโซไซม์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพ่อแม่พันธุ์และลูกผสมชั่วที่ 1 โดยดัดแปลงวิธีการทดลองมาจากวิธีการของ พสุ (2546)โดยใช้เอนไซม์ 5 ชนิดคือ Esterase (EST), Peroxidase (PER), Malic enzyme (ME), Malate dehydrogenase (MDH) และ Glutamate dehydrogenase (GDH) วิธีเตรียมสารเคมีแสดงในภาคผนวก ก

1.2.1 การเตรียมตัวอย่างพืชและการสกัด การสกัดเอนไซม์

โดยการนำใบอ่อนของคาร์เนชั่น มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ สกัดด้วย extraction buffer 1.5 มิลลิลิตร ต่อตัวอย่างพืช 0.5 กรัม แล้วบดในโกร่งที่เก็บในที่อุณหภูมิ -20 °ซ แล้วนำไปแยกส่วนด้วยเครื่องหมุนหวี่ยงความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 40 นาที ดูดสารละลายใส ที่ได้ในหลอด Eppendorf เก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ จากนั้นรอทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

1.2.2 การเตรียม slab gel

ประกอบชุดแผ่นกระจกของชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส Mini-Protean®II (Bio-Rad) เข้าด้วยกัน

1.2.2.1 นำสารละลาย separating gel (การเตรียมสารละลายอยู่ในภาคผนวก ก) มาหยอดลงระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ เหลือที่ว่างด้านบนไว้ประมาณ 2 เซนติเมตรจากนั้นค่อยๆ หยดน้ำกลั่นให้คลุมผิวเจลไว้ ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาทีให้เจลแข็งตัว เมื่อเจลแข็งตัวจะเห็นรอยต่อระหว่างเจล และน้ำ

1.2.2.2 ดูดน้ำออกแล้วเติมสารละลาย stacking gel (การเตรียมสารอยู่ในภาคผนวก ก) พร้อมกับเสียบหวี (comb) ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศในช่องที่เสียบหวีทิ้งไว้ประมาณ 60 นาที เมื่อเจลแข็งตัว ดึงหวีออกจะเห็นเป็นช่อง (well) แล้วล้างช่อง ด้วยน้ำกลั่น

1.2.3 การทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

1.2.3.1 ประกอบชุดอิเล็กโตร โฟรีซิสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม running buffer ลงใน chamber 500 มิลลิลิตร

1.2.3.2 หยอดตัวอย่างที่ผสมกับ tracking dye ในอัตราส่วน 100:5 ลงในช่องของ stacking gel ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ระวังอย่าให้ฟุ้งกระจาย

1.2.3.3 ปิดฝาครอบแล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟ เปิดสวิทช์ ตั้งค่ากระแสคงที่ที่ 24 มิลลิแอมแปร์สำหรับ separating gel แล้วดำเนินการผ่านกระแส

1.2.3.4 ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าเมื่อ tracking dye เคลื่อนที่ลงมาถึงปลายด้านล่างของเจล นำแผ่นกระจกออกจาก chamber แล้วแกะเจลออกจากแผ่นกระจก ตัดมุมของเจลเพื่อทำเครื่องหมาย แล้วนำมาวางบนจานแก้ว (plate) เพื่อย้อมสีเอนไซม์ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.4 การย้อมสีเจล

นำเจลที่ได้มาย้อมด้วย staining solution ของไอโซไซม์ชนิดต่างๆ รอจนเกิดแถบ แล้วล้างสีส่วนเกินออก

1.2.5 การบันทึกผลและวิเคราะห์ข้อมูล

นำเจลที่เกิดแถบสีมาบันทึก ค่าระยะทางของ tracking dye พร้อมทั้งบันทึกตำแหน่ง ขนาด จำนวนของแถบสี และรูปแบบการเกิดแถบสีของเอนไซม์แต่ละชนิด นำระยะทางการเคลื่อนที่ (ตำแหน่ง) ของแผ่นเจลมาคำนวณหาค่า การเคลื่อนที่สัมพันธ์ (relative migration)

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพันธ์} = \frac{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของแถบสี}}{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของ tracking dye}}$$

1.3 การศึกษาจำนวนโครโมโซมลูกผสมของคาร์เนชั่น

ดัดแปลงมาจากกรรมวิธีของ รุ่งนภา (2540)

1.3.1. การเตรียมปลายราก โดยเตรียมจากกิ่งชำคาร์เนชั่น ตัดเฉพาะส่วนปลายรากที่กำลังเจริญเติบโต เก็บปลายรากเวลา 8:00-9:00 น.

1.3.2 หยุดการเจริญเติบโตของเส้นใยสปินเดิลของเซลล์โดยการแช่ปลายรากในสารละลาย para- dichlorobenzene เป็นเวลา 1 2 3 4 5 หรือ 6 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 °ซ รักษาสภาพเซลล์โดยนำรากออกมาจากสารละลาย para - dichlorobenzene แล้วล้างปลายรากให้สะอาดด้วยน้ำ นำปลายรากไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ (fixative) นาน 10 นาที แล้วล้างปลายรากให้สะอาดด้วยน้ำ

1.3.3. แยกเซลล์โดยการแช่ปลายรากลงในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 N. เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 60 °ซ แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น

1.3.4. ย้อมสีเนื้อเยื่อด้วยสีย้อม carbol fuchsin โดยแช่นาน 24 ชั่วโมง

1.3.5. ขยี้เนื้อเยื่อปลายรากบนแผ่นสไลด์ หยดสี carbol fuchsin 1 หยดตรงบริเวณปลายราก แล้วใช้เข็มเขี่ยเคาะเนื้อเยื่อปลายรากให้แยกออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ปิดด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ นำกระดาษซับวางบนแผ่นสไลด์ บริเวณที่ปิดด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ ใช้นิ้วหัวแม่มือกดลงบนแผ่นสไลด์เพื่อให้เซลล์กระจาย และเป็นการซับสีที่เป็นส่วนเกินออก

1.3.6. นำแผ่นสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของรังสีเอกซ์ต่อการเจริญเติบโตและกลายพันธุ์

2.1 นำกิ่งชำคาร์เนชั่นที่มีรากแล้ว 2 สายพันธุ์ คือ Poker สีแดง และ Splendid สีชมพู (ภาพ 4 ก) จำนวน 20 ซ้ำแล้ว นำไปฉายรังสีเอกซ์ เฉพาะส่วนของยอดโดยใช้เครื่องกำเนิดรังสี CABINET X- ray APPARATUS SOFRON Type SVR-1005 CX. (ภาพ 4 ข)

2.2 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ 4 กรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ได้รับปริมาณรังสี 0 Gy

กรรมวิธีที่ 2 ได้รับปริมาณรังสี 10 Gy

กรรมวิธีที่ 3 ได้รับปริมาณรังสี 15 Gy

กรรมวิธีที่ 4 ได้รับปริมาณรังสี 20 Gy

2.3 นำกิ่งชำที่ฉายรังสีแล้วไปปลูก ลงในวัสดุปลูกที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้อุณหภูมิ 121 °ซ เวลา 45 นาที วัสดุปลูกประกอบด้วย ดินร่วน ทราย ขี้เถ้าแกลบ เปลือกข้าว ขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1:1:1:1:1 โดยปริมาตร

2.4 บันทึกข้อมูล ความสูง ความยาวก้านดอก จำนวนใบ จำนวนกิ่งแขนง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางดอก และลักษณะภายนอกที่เปลี่ยนแปลงเช่น ใบ สีดอก ทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS version 6.0

ก.

ข.

ภาพ 4 การเตรียมกิ่งชำคาร์เนชั่นก่อนการฉายรังสี

ก. ลักษณะกิ่งชำคาร์เนชั่นที่ใช้สำหรับฉายรังสี

ข. การฉายรังสีกิ่งชำคาร์เนชั่นด้วยตู้ฉายรังสีเอกซ์ CABINET X- ray APPARATUS SOFRON Type SVR-1005 CX.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

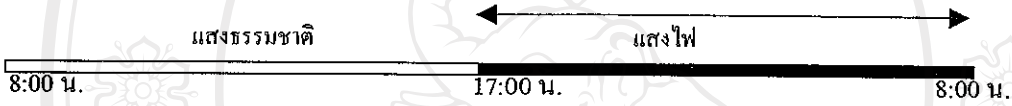
การทดลองที่ 3 ผลของความยาววันต่อการเจริญเติบโต

3.1 นำกิ่งชำคาร์เนชั่นที่มีรากแล้ว 4 สายพันธุ์ คือ Omeggio, Poker, Lior และ Splendid ปลูกในวัสดุปลูกที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

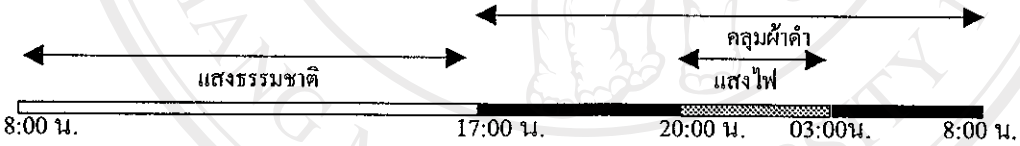
3.2 ใช้หลอดไฟ Incandescent ขนาด 60 วัตต์ ความเข้มแสงเฉลี่ยที่ปลายยอดพืช 4,500 ลักซ์ ติดตั้ง Timer เป็นเพศตั้งเวลาเปิด/ปิด ไฟตามเวลาที่กำหนดในแต่ละกรรมวิธี

3.2 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ กรรมวิธีการศึกษาแสดงดังภาพ 5 บันทึกข้อมูล ความสูง ความยาวก้านดอก จำนวนใบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางดอก และจำนวนวันที่ใช้ในการปลูก

กรรมวิธีที่ 1 ได้รับความยาวช่วงแสงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยได้รับช่วงแสงต่อจาก แสงธรรมชาติ 15 ชม. ระหว่างเวลา 17:00 ถึง 8:00 น.



กรรมวิธีที่ 2 ได้รับความยาวช่วงแสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยได้รับช่วงแสงต่อจาก แสงธรรมชาติ 7 ชม. ระหว่างเวลา 22:00 ถึง 02:00 น.



กรรมวิธีที่ 3 ได้รับความยาวช่วงแสงเป็นเวลา 8 ชั่วโมง โดยได้รับช่วงแสงธรรมชาติ 8 ชม. คลุมผ้าดำ 16 ชม. ระหว่างเวลา 16:00 ถึง 8:00 น.

กรรมวิธีที่ 4 ได้รับสภาพแสงธรรมชาติ ในช่วงเดือน ตุลาคม 2544- มีนาคม 2545 (ตารางภาคผนวก ง)

ภาพ 5 กรรมวิธีการศึกษาผลของความยาววัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 4 ผลการใช้สารชีวภัณฑ์ *Trichoderma* spp. ต่อการลดการเกิดโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อ ***Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi***

4.1 วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมแบบสุ่มสมบูรณ์ (3×2×3)มี 8 ซ้ำโดยศึกษาปัจจัยร่วมต่างๆ ดังนี้

ปัจจัยที่ 1 พันธุ์พืชทดลอง ใช้คาร์เนชั่น สายพันธุ์ Omeggio (ชมพู), Poker (แดง) และ Splendid (ชมพู)

ปัจจัยที่ 2 วัสดุปลูก 2 ชนิดคือ

1. ดินที่มีเชื้อ Fusarium
2. ดินที่ไม่มีเชื้อ Fusarium (ดินอบ)

ปัจจัยที่ 3 ช่วงระยะเวลาในการใส่สารชีวภัณฑ์ *Trichoderma* spp.

1 .ไม่ใส่ สารชีวภัณฑ์ *Trichoderma* spp.

2 .ใส่ สารชีวภัณฑ์ *Trichoderma* spp. ทุก 2 สัปดาห์

3.ใส่ สารชีวภัณฑ์ *Trichoderma* spp. ทุก 4 สัปดาห์

4.2 การเตรียมดินที่ใช้ในการทดลอง ดินที่มีเชื้อ Fusarium ก่อนการปลูกนำเชื้อ Fusarium ที่ได้จากการเลี้ยงในเมล็ดข้าวฟ่างคลุกผสมลงในดินปลูก นำดินที่ใช้ในการทดลองมาตรวจหาเชื้อในห้องปฏิบัติการ โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารวุ้นเพื่อทดสอบว่าดินที่ปลูกมีเชื้อ Fusarium

4.3 การเตรียมดินอบ โดยอบดินสำหรับการทดลอง ด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 45 นาที

4.4 การใส่สารชีวภัณฑ์ *Trichoderma* spp. สารชีวภัณฑ์ที่ใช้ให้อยู่ในรูปเชื้อเมล็ดข้าวฟ่าง (ภาพ 6) การใส่เชื้อกระทำโดยคลุกเชื้อลงไปในดิน ปริมาตร 1.5 กรัมต่อกระถางขนาด 6 นิ้ว

4.5 บันทึกข้อมูล ความสูง ความยาวก้านดอก จำนวนใบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางดอก และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS version 6.0

ภาพ 6 สารชีวภัณฑ์ *Trichoderma* spp. ที่เจริญบนเมล็ดข้าวฟ่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

สิงหาคม 2545 - พฤศจิกายน 2546

สถานที่ดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

- การทดลอง การปรับปรุงพันธุ์ โดยการผสมพันธุ์ การศึกษาความยาววันที่มีต่อการเจริญเติบโตและ ผลการใช้สารชีวภัณฑ์ *Trichoderma* spp. ต่อการลดการเกิดโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* ดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูลที่ โรงเรือนเพาะชำ สถานีวิจัยโครงการหลวง อินทนนท์ บ้านขุนกลาง อ.จอมทอง จ. เชียงใหม่

- การทดลองการฉายรังสีเอกซ์ การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพ่อแม่และลูกผสมโดยวิธีการวิเคราะห์ไอโซไซม์ และการศึกษาจำนวนโครโมโซมลูกผสมของคาร์เนชั่น ดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูลที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved