บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 **พืชทดลอง** คือ ว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นบ้านดอกเล็กสีแดง (ภาพที่ 1) และว่านสี่ทิศลูกผสมดอกใหญ่พันธุ์ Apple Blossom ดอกสีชมพู (ภาพที่ 2) จากศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

ส่วนของพืชที่ใช้ศึกษาทดลองคือ หัวของว่านสี่ทิศทั้ง 2 พันธุ์ ขนาดของหัวที่ใช้มี 4 ขนาด คือ เส้นรอบวงของหัว 12.1-14.0 14.1-16.0 16.1-18.0 และ 18.1-20.0 เซนติเมตร

1.2 **วัสดุและอุปกรณ์ เพื่อใช้ในการปลูกพืชทดลอง**

1.2.1 วัสดุปลูก คือ ดิน ขี้เถ้าแกลบ และเปลือกถั่ว ในอัตราส่วน 2:1:1
1.2.2 ถุงพลาสติกสีดำ ขนาดกว้าง 6 นิ้ว
1.2.3 วัสดุเพาะชำ คือ ทรายและขี้เถ้าแกลบ ในอัตราส่วน 1:1
1.2.4 กระบะพลาสติก
1.2.5 ตาข่ายพลาสติกเพื่อพรางแสง 50 เปอร์เซ็นต์
1.2.6 สายยางรดน้ำพร้อมฝักบัว
1.2.7 อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ มีด ไม้บรรทัด เวอร์เนีย เครื่องชั่งไฟฟ้า และกล้องถ่ายรูป

ภาพที่ 1. ว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นบ้านดอกเล็กสีแดง

ภาพที่ 2. ว่านสี่ทิศลูกผสมดอกใหญ่พันธุ์ Apple Blossom

1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

1.3.1 ขวดพลาสติกขนาดเล็ก และหลอดแก้ว (vial) สำหรับใส่น้ำยาเคมี และสำหรับใส่เนื้อเยื่อในการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อของพืชทดลอง

1.3.2 ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ระดับอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

1.3.3 เครื่องตัดเนื้อเยื่อพืชแบบล้อหมุน (rotary microtome)

1.3.4 แท่งไม้ขนาด 3.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่ผ่านการต้มให้อิ่มตัวในพาราฟิน

1.3.5 แผ่นสไลด์พร้อมแผ่นปิดสไลด์

1.3.6 แผ่นความร้อนสำหรับอุ่นสไลด์

1.3.7 ขวดแก้วสำหรับย้อมสีเนื้อเยื่อ

1.3.8 กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์การถ่ายภาพ

1.3.9 อุปกรณ์อื่นๆ เช่น ตะเกียงแอลกอฮอล์ เข็มเขี่ย และใบมีดโกน เป็นต้น

1.4 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเนื้อเยื่อพืช เพื่อการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา (ภูวดล, 2528)

1.4.1 น้ำยาสำหรับฆ่าและรักษาสภาพเซล (Killing and fixing solution) คือ น้ำยา FAA (Formalin Aceto Alcohol) ซึ่งประกอบด้วยสารเคมีในอัตราส่วน ดังต่อไปนี้

Ethyl alcohol	50 มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	5 มิลลิลิตร
Formalin	10 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	35 มิลลิลิตร

1.4.2 น้ำยาสำหรับดึงน้ำออกจากเซล (Dehydrating solution)

น้ำยามีส่วนผสมของ ethyl alcohol และ tertiary butyl alcohol (TBA) ในอัตราส่วนต่างๆ กัน ตั้งแต่ระดับ 70 เปอร์เซ็นต์ของน้ำยา ไปจนถึง 100 เปอร์เซ็นต์ของน้ำยา ดังแสดงส่วนผสมและอัตราส่วนของสารเคมีไว้ในตารางที่ 1

1.4.3 สารตัวกลาง ที่ใช้สำหรับฝังเนื้อเยื่อเพื่อการตัด (embedding media) ได้แก่ Paraplast

1.4.4 น้ำยายึดเนื้อเยื่อให้ติดบนแผ่นสไลด์ (adhesive) ได้แก่ albumin

1.4.5 น้ำยาทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing reagent) ได้แก่ xylol

ตารางที่ 1. ส่วนผสมและอัตราส่วนของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้สำหรับดึงน้ำออกจากเซล

สารเคมี	อัตราส่วน			
	70%	85%	95%	100%
Ethyl alcohol (95%)	50	50	50	-
Absolute ethyl alcohol	-	-	-	25
TBA	20	35	50	75
น้ำกลั่น	30	15		

1.4.6 สีสังเคราะห์สำหรับย้อมเนื้อเยื่อ คือ Dalafield's hematoxylin ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสม ดังต่อไปนี้

Aluminium sulfate [$Al_2(SO_4)_3 \cdot 16H_2O$]	400 มิลลิลิตร
Hematoxylin	4 กรัม
95% ethyl alcohol	25 มิลลิลิตร
Methyl alcohol	100 มิลลิลิตร
Glycerol	100 มิลลิลิตร

1.4.7 สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นสไลด์ใช้ Canada balsam (Merck)

2. วิธีการทดลอง

2.1 การสร้างและการพัฒนาของหัวในสภาพธรรมชาติ

การศึกษาในหัวข้อนี้ เป็นการศึกษาในลักษณะของการติดตามการเจริญเติบโตของว่านสี่ทิศจากหัวที่มีขนาดต่าง ๆ เป็นการศึกษาการเจริญเติบโตในวงจรการเจริญเติบโตตั้งแต่เริ่มมีการเจริญเติบโตจากหัวที่หมดระยะพักตัวแล้ว จนกระทั่งถึงระยะปลายของวงจรการเจริญเติบโต คือระยะที่ต้นหยุดการเจริญเติบโตทางใบ และหัวเข้าระยะพักตัวอีกครั้งหนึ่ง โดยวงจรชีวิต 1 รอบ ใช้เวลา 1 ปี จากการติดตามการเจริญเติบโตดังกล่าวจะทำให้ทราบข้อมูลในด้านการสร้างหัวใหม่ และการเจริญเติบโตของหัวเหล่านั้นในวงจรชีวิต

ทำการศึกษาว่านสี่ทิศ 2 พันธุ์ คือ พันธุ์พื้นบ้านดอกเล็กสีแดง และพันธุ์ลูกผสมพันธุ์ Apple Blossom โดยใช้หัวที่มีขนาดเส้นรอบวงของหัว 4 ขนาด คือ 12.1-14.0 14.1-16.0 16.1-18.0 และ 18.1-20.0 เซนติเมตร ปลูกหัวดังกล่าวในถุงดำ ถุงละ 1 หัว พันธุ์ละ 120 หัว และเลี้ยงในสภาพธรรมชาติเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตทางใบของต้นเหล่านั้น หลังจากปลูกไปแล้ว 1 เดือน ทำการสุ่มต้นว่านสี่ทิศมาศึกษา เดือนละ 10 ต้น เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงและการพัฒนาของตาที่ซอกกาบใบของหัว การเกิดและการพัฒนาของหัวใหม่และหัวย่อย พร้อมทั้งทำการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของตาภายในหัว โดยใช้เทคนิค paraffin embedding ของ Johansen (1940)

การบันทึกข้อมูล มีดังนี้

2.1.1 การเจริญเติบโตทางใบของต้นที่เจริญเติบโตจากหัวที่ใช้ปลูก โดยบันทึกความยาวของใบและจำนวนใบต่อต้นทุก ๆ สัปดาห์

2.1.2 ข้อมูลการเจริญเติบโตของหัวที่สุ่มเก็บทุกเดือน

2.1.2.1 ขนาดเส้นรอบวงของหัว

2.1.2.2 จำนวนกาบใบต่อหัว

2.1.2.3 ตำแหน่งของกาบใบที่พบตาข้างนับจากกาบใบนอกเข้าไป

2.1.2.4 ตำแหน่งของกาบใบที่พบตาดอกนับจากกาบใบนอกเข้าไป

2.1.2.5 ผลผลิตของหัวใหม่ และหัวย่อยต่อต้น ซึ่งเก็บเกี่ยวหลังจากที่ต้นแม่เข้าระยะพักตัว

2.2 การสร้างและการพัฒนาของหัวย่อยจากการขยายพันธุ์โดยวิธีผ่าหัว

การศึกษาในหัวข้อนี้เป็นการศึกษาความสามารถในการขยายพันธุ์ว่านสี่ทิศจากหัวโดยการผ่าหัวออกเป็นชิ้น ในลักษณะของ bulb cutting แล้วนำชิ้นส่วนเหล่านั้นไปชำเพื่อให้เกิดต้นใหม่ และหัวใหม่ ว่านสี่ทิศที่ใช้ในการศึกษาคือ 2 พันธุ์ ที่ใช้ในการทดลองที่ 1

หัวที่ใช้ในการทดลองมี 3 ขนาดด้วยกันคือ หัวที่มีเส้นรอบวง 16.1-18.0 เซนติเมตร (ขนาด C) 18.1-20.0 เซนติเมตร (ขนาด B) และ 20.1-22.0 เซนติเมตร (ขนาด A)

2.2.1 วิธีการผ่าหัว

ทำการผ่าหัวเป็นชิ้น 2 ลักษณะด้วยกันคือ

2.2.1.1 ผ่าหัวตามยาว ให้ผ่านจุดศูนย์กลางของหัว ให้ได้ชิ้นส่วนจากการผ่าหัวเป็น 4 , 8 และ 16 ชิ้น นำชิ้นส่วนเหล่านั้นไปชำในวัสดุเพาะชำใน 1.2.3 ในกระบะเพาะเลี้ยง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design) โดยจัดสิ่งทดลองแบบปัจจัยร่วม โดยให้ปัจจัยที่ 1 เป็นขนาดของหัว และปัจจัยที่ 2 เป็นจำนวนชิ้นแบ่ง มีกรรมวิธีเป็น 9 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ

2.2.1.2 ผ่าหัวในลักษณะของ twin scaling โดยทำการผ่าหัวตามยาวให้ได้หัวละ 8 ชิ้น ตามวิธีการใน 2.2.1.1 แล้วตัดแยกอีกครั้ง โดยแยกให้แต่ละชิ้นจาก 8 ชิ้นที่ได้นั้นออกเป็นชิ้นย่อยที่แต่ละชิ้นมีกาบใบติดกัน 2 อัน จากหนึ่งชิ้นใหญ่แยกเอามาเพียง 3 ชิ้นคู่ โดยเริ่มจากกาบใบนอกสุดของหัว หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนที่ได้ไปชำในกระบะเช่นเดียวกับที่ทำใน 2.2.1.1 สำหรับการทดลองนี้หัวที่ใช้ในการทดลองใช้เพียง 2 ขนาด คือ หัวขนาด A และ B

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ จัดสิ่งทดลองแบบปัจจัยร่วม โดยให้ปัจจัยที่ 1 เป็นขนาดของหัว และปัจจัยที่ 2 เป็นตำแหน่งของกาบใบคู่ (twin scale) มีกรรมวิธีเป็น 6 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ

นำกระบะจาก 2.2.1.1 และ 2.2.1.2 ไปตั้งไว้ในโรงเรือนกรองแสง 50 เปอร์เซ็นต์ ดูแลรดน้ำให้สม่ำเสมอ

2.2.2 การบันทึกการทดลอง

เมื่อนำชิ้นส่วนที่ตัดแบ่งไปชำแล้วมีการสร้างหัวย่อยขึ้นมา และหัวย่อยเหล่านั้นงอกเป็นต้นมีการเจริญเติบโต และมีความแข็งแรงเพียงพอแล้วจึงทำการย้ายลงปลูกในถุงดำ ภายใต้โรงเรือนกรองแสง และเมื่อต้นเข้าสู่ระยะพักตัว จึงทำการเก็บเกี่ยวหัวขึ้นมา บันทึกผลการทดลอง ดังนี้

2.2.2.1 วันที่ต้นอ่อนเริ่มงอกออกมาจากชิ้นส่วนของหัวที่นำไปชำ

2.2.2.2 จำนวนใบของหัวใหม่ที่เกิดขึ้น

2.2.2.3 อัตราการเกิดหัวใหม่ ซึ่งเก็บข้อมูลก่อนย้ายปลูก

2.2.2.4 จำนวนวันนับจากการชำชิ้นส่วนหัวจนถึงวันที่เก็บเกี่ยวหัว

2.2.2.5 ผลผลิตของหัวใหม่ที่ได้จากการขยายพันธุ์โดยการตัดแบ่งในแต่ละกรรมวิธี

2.2.2.6 ขนาดของหัวใหม่ที่เกิดขึ้น

2.2.2.7 น้ำหนักของหัวใหม่ที่เกิดขึ้น

3. สถานที่ในการดำเนินการวิจัย

3.1 แปลงทดลองของศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผล บ้านไร่ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ. หางดง จ. เชียงใหม่

3.2 ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

4. ระยะเวลาในการดำเนินการทำวิจัย

ตั้งแต่ เดือนพฤษภาคม 2539 ถึงเดือนมกราคม 2541

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University