# บทที่ 3

# อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

**การทดลองที่ 1 การสร้างหัวย่อยในสภาพธรรมชาติ**

การทดลองนี้เป็นการศึกษาการสร้างหัวย่อยของแกลดิโอลัสในสภาพธรรมชาติ โดยนำหัวแกลดิโอลัสที่มีเส้นรอบวง 8-10 ซม ปลูกเลี้ยงไว้ในสภาพกลางแจ้ง หลังจากที่ต้นเริ่มมีการเจริญเติบโตจึงขุดขึ้นมาศึกษาจุดกำเนิดและการเจริญเติบโตของหัวย่อย ทำการศึกษาตลอดช่วงที่มีการเจริญเติบโตของต้น

ในระยะที่จุดกำเนิดของหัวย่อยมีขนาดเล็ก ศึกษาเนื้อเยื่อบริเวณดังกล่าวด้วยวิธีการเตรียมเนื้อเยื่อแบบ paraffin embedding technique (Johansen, 1940) แล้วศึกษาเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

**1.1 วัสดุและอุปกรณ์**

1.1.1 หัวของแกลดิโอลัสจำนวน 6 พันธุ์ คือ พันธุ์ลูกผสมจากต่างประเทศคือ พันธุ์ Diablo, Falcon, Globestar, Orbiter และ Spitfire และ พันธุ์พื้นบ้าน ที่มีขนาดเส้นรอบวงหัว 8-10 ซม จากศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

1.1.2 วัสดุปลูกคือ ดินผสมขี้เถ้าแกลบและเปลือกถั่วในอัตราส่วน 3:2:1

1.1.3 ถุงพลาสติกสีดำขนาด 10 x 12 นิ้ว

1.1.4 เวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์

1.1.5 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการตัดชิ้นส่วนพืช เพื่อการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา โดยวิธีการ paraffin embedding

1.1.5.1 เครื่องตัดชิ้นส่วนพืชแบบล้อหมุน (rotary microtome)

1.1.5.2 ตู้อบ (hot air oven) ที่มีอุณหภูมิ 56 °ซ

1.1.5.3 แผ่นให้ความร้อน (hot plate)

1.1.5.4 กล้องจุลทรรศน์สองตาแบบสเตอริโอ (stereo microscope)

1.1.5.5 กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ (photomicroscope)

1.1.5.6 แท่งไม้ขนาด 1.5 x 1.5 x 1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่ต้มให้อิ่มตัวในพาราฟิน

1.1.5.7 หลอดแก้วสำหรับใส่ชิ้นส่วนพืช (vial)

1.1.5.8 กระจกสไลด์ และกระจกปิดสไลด์ (slide และ coverslip)

1.1.5.9 ขวดแก้วสำหรับย้อมสี (staining jar)

1.1.5.10 ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.1.5.11 วัสดุอื่นๆ ได้แก่ มีดผ่าตัด ปากคีบ เข็มเขี่ย ไม้ขีดไฟ และกระดาษแข็ง

1.1.6 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมชิ้นส่วนพืชและสไลด์ถาวร

1.1.6.1 น้ำยาที่ใช้ในการฆ่าเซล และรักษาสภาพเซล (killing and fixing solution) คือ FAA (formalin-acetic acid-alcohol) มีส่วนผสมของสารเคมี ดังนี้

| | |
|---|---|
| ethyl alcohol (95%) | 50 มล |
| glacial acetic acid | 5 มล |
| formalin | 10 มล |
| น้ำกลั่น | 35 มล |

1.1.6.2 น้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซล (dehydrating solution) ประกอบด้วย ethyl alcohol (95%), absolute alcohol, tertiary butyl alcohol (TBA) และน้ำกลั่น โดยใช้ส่วนผสมในอัตราที่แตกต่างกัน 4 ระดับ ตามวิธีของ Sass (1966) ดังตารางที่ 2

1.1.6.3 paraffin oil

1.1.6.4 สารตัวกลางที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อ (embedding media) ได้แก่ Paraplast

1.1.6.5 น้ำยายึดเนื้อเยื่อให้ติดแผ่นสไลด์ (adhesive) คือ albumin ซึ่ง stock solution ของน้ำยา มีส่วนผสม ดังนี้

| | |
|---|---|
| ไข่ขาว | 1 มล |
| น้ำกลั่น | 49 มล |

นำ stock solution 1 มล เติมน้ำกลั่นให้ครบ 50 มล แล้วจึงนำไปใช้

1.1.6.6 น้ำยาทำให้เนื้อเยื่อใสสะอาด (clearing reagent) ได้แก่ xylol

1.1.6.7 สีย้อมเนื้อเยื่อ ได้แก่ Delafield's hematoxylin ที่มีส่วนผสม ดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| ammonium aluminium sulphate | 400 | มล (อิ่มตัวในน้ำ) |
| hematoxylin | 4 | กรัม |
| 95 % ethyl alcohol | 25 | มล |
| methyl alcohol | 100 | มล |
| glycerol | 100 | มล |

1.1.6.8 สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นสไลด์ คือ Canada balsam

ตารางที่ 2 อัตราส่วนของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซล

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

**1.2 วิธีการ**

การศึกษาการสร้างหัวย่อยในสภาพธรรมชาติเป็นการติดตามการสร้างและการเจริญเติบโตของหัวย่อย โดยปลูกหัวพันธุ์แกลดิโอลัสทุกพันธุ์ ดังข้อ 1.1.1 ในถุงพลาสติกที่บรรจุเครื่องปลูกแล้วเลี้ยงไว้กลางแจ้ง เมื่อต้นมีการเจริญเติบโตจึงขุดต้นขึ้นมาศึกษาจุดกำเนิด และการเจริญเติบโตของหัวย่อยตลอดช่วงที่มีการเจริญเติบโตของต้น ในระยะที่จุดกำเนิดของหัวย่อยมีขนาดเล็กศึกษาเนื้อเยื่อบริเวณดังกล่าวด้วยวิธีการเตรียมเนื้อเยื่อแบบ paraffin embedding แล้วศึกษาเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

วิธีการศึกษาเนื้อเยื่อมีดังต่อไปนี้

1.2.1 ตัดตัวอย่างเนื้อเยื่อบริเวณที่มีการกำเนิดหัวย่อยไปแช่ในน้ำยา FAA เพื่อหยุดการทำงานของเซลและรักษาสภาพเซล ให้เนื้อเยื่อแช่อยู่ในน้ำยาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปผ่านขั้นตอนต่อไป

1.2.2 ดึงน้ำออกจากเซลของเนื้อเยื่อ โดยผ่านเนื้อเยื่อจาก FAA ลงในน้ำยาระดับต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2 จากระดับ 50% ไปจนถึง 100% โดยให้เนื้อเยื่ออยู่ในน้ำยาแต่ละระดับเป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อไปผ่าน TBA 3 ครั้ง ครั้งละ 6-24 ชั่วโมง แล้วผ่านลงในน้ำยาที่มีส่วนผสมของ TBA และ paraffin oil อัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง

1.2.3 นำเนื้อเยื่อไปผ่านขั้นตอนของ infiltration โดยให้เนื้อเยื่อแช่ใน Paraplast ที่หลอมในขวดแก้ว นำขวดไปเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 56 °ซ เพื่อให้พาราฟินซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นจึงนำเนื้อเยื่อไปฝังในพาราฟินเพื่อการตัดเนื้อเยื่อต่อไป

1.2.4 นำชิ้นส่วนที่ฝังไว้ในพาราฟินมาติดเข้ากับแท่งไม้ แล้วนำไปตัดโดยใช้เครื่องตัดชิ้นส่วนพืชแบบล้อหมุน ตัดชิ้นส่วนตามยาวและตามขวาง ให้มีความหนา 13-15 ไมครอน

1.2.5 นำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่ตัดได้มาติดบนแผ่นสไลด์โดยใช้ adhesive เป็นตัวยึดให้ติดกับสไลด์

1.2.6 นำชิ้นส่วนไปผ่านขั้นตอนของการย้อมสี Delafield's hematoxylin แล้วทำความสะอาดเนื้อเยื่อ โดยผ่านสไลด์ลงใน xylol ก่อนจะปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ โดยใช้ Canada balsam เป็นตัวยึด

1.2.7 นำเนื้อเยื่อไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพเนื้อเยื่อ

**การทดลองที่ 2 ผลของปัจจัยที่มีต่อการสร้างหัวย่อย**

การทดลองนี้แบ่งออกเป็น 4 การทดลองย่อย ในแต่ละการทดลองใช้แกลดิโอลัส 3 พันธุ์

**2.1. ผลของความยาววัน**

การทดลองนี้เป็นการศึกษาผลของความยาววันที่มีต่อการสร้าง และการเจริญเติบโตของหัวย่อย โดยให้ต้นแกลดิโอลัสเจริญเติบโตในสภาพความยาววันที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ ให้ได้รับแสง 6, 8 หรือ 10 ชั่วโมงต่อวัน โดยการคลุมผ้าดำหรือให้แสงเพิ่มจากหลอดไฟตามจำนวนชั่วโมงรับแสงที่กำหนดไว้

**2.1.1 วัสดุ และอุปกรณ์**

2.1.1.1 หัวแกลดิโอลัส ขนาดเส้นรอบวง 8-10 ซม ของพันธุ์ Diablo, Globestar และ Orbiter

2.1.1.2 หลอดไฟ 100 ลักซ์ พร้อมสายไฟ

2.1.1.3 เครื่องควบคุมการปิด-เปิดไฟ

2.1.1.4 โครงไม้ไผ่ และผ้าดำ

2.1.1.5 วัสดุปลูก คือ ดินผสมขี้เถ้าแกลบ และเปลือกถั่ว ในอัตราส่วน 3:2:1

2.1.1.6 ถุงพลาสติกสีดำขนาด 10x12 นิ้ว

2.1.1.7 เวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์

2.1.1.8 เครื่องชั่งไฟฟ้า

2.1.1.9 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการตัดชิ้นส่วนพืชเพื่อศึกษาเนื้อเยื่อ ดังข้อ 1.1.5

2.1.1.10 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมชิ้นส่วนพืชและสไลด์ถาวร ดังข้อ 1.1.6

**2.1.2 วิธีการ**

2.1.2.1 ปลูกหัวแกลดิโอลัสไว้กลางแจ้ง เมื่อต้นมีใบ 3 ใบต่อต้น จึงให้กรรมวิธีความยาววัน โดยการคลุมต้นด้วยผ้าดำหรือการให้แสงเพิ่ม

2.1.2.2 ติดตามการเกิดของจุดกำเนิดของหัวย่อย โดยการเก็บตัวอย่างเนื่อเยื่อบริเวณที่เป็นจุดกำเนิดหัวย่อยเพื่อศึกษาเนื้อเยื่อ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ตามความจำเป็นในกรณีที่มีการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติ

2.1.2.3 เก็บเกี่ยวหัวใหม่และหัวย่อยหลังจากที่ต้นตายแล้ว

2.1.2.4 บันทึกข้อมูลของผลผลิตของหัว คือ จำนวนและน้ำหนักของหัวใหม่ต่อต้น และจำนวนและน้ำหนักของหัวย่อยต่อต้นในแต่ละกรรมวิธี

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) กรรมวิธีละ 30 ซ้ำ ๆ ละ 1 หัว

**2.2 ผลของความลึกในการปลูกหัวพันธุ์**

การทดลองนี้เป็นการศึกษาผลของความลึกในการปลูกหัวพันธุ์ ที่มีต่อการสร้างและการเจริญเติบโตของหัวย่อย โดยการปลูกหัวพันธุ์ที่ความลึก 4 ระดับ คือ ปลูกลึก 1, 2, 3 และ 4 นิ้ว จากระดับผิวเครื่องปลูก

**2.2.1 วัสดุ และอุปกรณ์**

2.2.1.1 หัวแกลดิโอลัส ขนาดเส้นรอบวง 8-10 ซม ของพันธุ์ Diablo, Globestar และ Orbiter

2.2.1.2 วัสดุปลูก คือ ดินผสมขี้เถ้าแกลบ และเปลือกถั่ว ในอัตราส่วน 3:2:1

2.2.1.3 ถุงพลาสติกสีดำขนาด 10x12 นิ้ว

2.2.1.4 เวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์

2.2.1.5 เครื่องชั่งไฟฟ้า

2.2.1.6 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการตัดชิ้นส่วนพืช และสารเคมีเพื่อใช้ในการศึกษาเนื้อเยื่อดังข้อ 1.1.5 และข้อ 1.1.6

**2.2.2 วิธีการ**

2.2.2.1 ปลูกหัวแกลดิโอลัสที่ระดับความลึก 4 ระดับ และให้ต้นเจริญเติบโตกลางแจ้ง

2.2.2.2 ติดตามการเจริญของจุดกำเนิดของหัวย่อย เช่นเดียวกับในข้อ 2.1.2.2

2.2.2.3 เมื่อต้นแกลดิโอลัสตายแล้วเก็บเกี่ยวหัวใหม่และหัวย่อยขึ้นมาเพื่อบันทึกผลเช่นเดียวกับข้อ 2.1.2.4

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ กรรมวิธีละ 30 ซ้ำๆ ละ 1 หัว

**2.3 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต**

การทดลองนี้เป็นการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสร้างและการเจริญเติบโตของหัวย่อย โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 4 ชนิด คือ 4-(indol-3-yl) butyric acid (IBA), gibberellic acid ($GA_3$), benzyladinine (BA) และ Ethephon เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมซึ่งไม่ได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโต

**2.3.1 วัสดุ และอุปกรณ์**

2.3.1.1 หัวแกลดิโอลัสขนาดเส้นรอบวง 8-10 ซม ของพันธุ์พื้นบ้าน พันธุ์ Falcon และ Spitfire

2.3.1.2 สารละลาย IBA เข้มข้น 100 สตล

2.3.1.3 สารละลาย $GA_3$ เข้มข้น 100 สตล

2.3.1.4 สารละลาย BA เข้มข้น 100 สตล

2.3.1.5 สารละลาย Ethephon เข้มข้น 1,000 สตล

2.3.1.6 วัสดุปลูก คือ ดินผสมขี้เถ้าแกลบ และเปลือกถั่ว ในอัตราส่วน 3:2:1

2.3.1.7 ถุงพลาสติกสีดำขนาด 10x12 นิ้ว

2.3.1.8 เวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์

2.3.1.9 เครื่องชั่งไฟฟ้า

2.3.1.10 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการตัดชิ้นส่วนพืช และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาเนื้อเยื่อ ดังข้อ 1.1.5 และ 1.1.6

**2.3.2 วิธีการ**

2.3.2.1 นำหัวแกลดิโอลัสแช่ในสารละลาย IBA, BA, $GA_3$ และ Ethephon เป็นเวลา 5 นาที, 2, 24 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

2.3.2.2 ปลูกหัวพันธุ์และเลี้ยงให้เจริญเติบโตกลางแจ้ง

2.3.2.3 ติดตามการเกิดและการเจริญของจุดกำเนิดของหัวย่อย เช่นเดียวกับในข้อ 2.1.2.2

2.3.2.4 เมื่อต้นแกลดิโอลัสตายแล้วเก็บเกี่ยวหัวใหม่และหัวย่อย เพื่อบันทึกผลเช่นเดียวกับข้อ 2.1.2.4

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ กรรมวิธีละ 30 ซ้ำๆ ละ 1 หัว

**2.4 ผลของการรมควันหัวพันธุ์ก่อนปลูก**

การทดลองนี้เป็นการศึกษาผลของการรมควันหัวพันธุ์ก่อนปลูกต่อการสร้างและการเจริญเติบโตของหัวย่อย โดยการนำหัวพันธุ์ไปรมควันเป็นเวลานาน 0, 1, 3, 5, 7 และ 9 ชั่วโมง ก่อนนำหัวไปปลูก

**2.4.1 วัสดุ และอุปกรณ์**

2.4.1.1 หัวแกลดิโอลัสขนาดเส้นรอบวง 8-10 ซม ของพันธุ์พื้นบ้าน พันธุ์ Falcon และ Spitfire

2.4.1.2 ขุยมะพร้าวและใยมะพร้าว

2.4.1.3 กล่องไม้และแท่งพลาสติก

2.4.1.4 เทอร์โมมิเตอร์

2.4.1.5 ตะกร้าพลาสติกทรงเตี้ย

2.4.1.6 วัสดุปลูก คือ ดินผสมขี้เถ้าแกลบ และเปลือกถั่ว ในอัตราส่วน 3:2:1

2.4.1.7 ถุงพลาสติกสีดำขนาด 10x12 นิ้ว

2.4.1.8 เวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์

2.4.1.9 เครื่องชั่งไฟฟ้า

2.4.1.10 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการตัดชิ้นส่วนพืช และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาเนื้อเยื่อ ดังข้อ 1.1.5 และ 1.1.6

**2.4.2 วิธีการ**

2.4.2.1 นำหัวแกลดิโอลัสไปรมควัน โดยใช้ขุยมะพร้าวและใยมะพร้าวเป็นวัสดุในการทำให้เกิดควัน และควบคุมอุณหภูมิการรมควันไม่ให้เกิน 35 °ซ

2.4.2.2 นำหัวพันธุ์ที่รมควันแล้วไปปลูกให้เจริญเติบโตกลางแจ้ง

2.4.2.3 ติดตามการเกิดและการเจริญของจุดเจริญของหัวย่อย เช่นเดียวกับข้อ 2.1.2.2

2.4.2.4 เมื่อต้นแกลดิโอลัสตายแล้วเก็บเกี่ยวหัวใหม่และหัวย่อย เพื่อบันทึกผลเช่นเดียวกับข้อ 2.1.2.4

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ กรรมวิธีละ 30 ซ้ำ ๆ ละ 1 หัว

**สถานที่ทำการวิจัย**

แปลงทดลองของ ศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

**ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย**

เดือนสิงหาคม 2541 – กันยายน 2543