บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 การผสมพันธุ์กุหลาบ

ผสมกุหลาบ 4 พันธุ์ ได้แก่ Dallus (สีแดง) Nobless (สีชมพู) Saphir (สีชมพู) และ Vivaldi (สีชมพูอ่อน) ซึ่งเป็นกุหลาบพันธุ์ตัดดอก (Hybrid Tea) โดยการผสมตัวเองและผสมข้ามแบบพบกันหมดรวมทั้งการ ผสมสลับ รวมทั้งหมด 16 คู่ เพื่อสร้างเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1

1.1 การผสมพันธุ์

1.1.1 การเตรียมดอกเพื่อใช้เป็นต้นแม่ เลือกดอกแย้มไม่ตูมหรือบานเกินไปดึงกลีบดอกออกแล้วใช้กรรไกรหรือมีดคมๆตัดเกสรตัวผู้ที่อยู่ล้อมรอบออกให้หมด (ยกเว้นดอกที่ทำการผสมตัวเองจะไม่ตัดละอองเกสรออก) เหลือเพียงเกสรตัวเมียเท่านั้น แล้วใช้ถุงกระดาษคลุมดอกไว้ เมื่อดอกพร้อมผสมที่ยอดเกสรตัวเมียจะมียางเหนียวสีขาวใส

1.1.2 เตรียมดอกพันธุ์พ่อที่อยู่ในระหว่างแย้มบานแต่ไม่บานเต็มที่เมื่ออับละอองเกสรตัวผู้แตกออกละอองเกสรมีสีเหลืองใช้พู่กันรวบรวมละอองเกสรใส่ภาชนะแล้วนำไปแตะบนปลายยอดเกสรตัวเมียที่พร้อมผสมช่วงเวลาที่เหมาะแก่การผสมของกุหลาบคือตั้งแต่ 9.00–12.00 น.

1.1.3 คลุมดอกที่ผสมแล้วด้วยถุงกระดาษติดป้ายบันทึกคู่ผสม สังเกตดูประมาณ 7 วัน ฝักที่ผสมติดจะยังคงมีสีเขียวอยู่ ถ้าไม่ติดฝักจะแห้งเหี่ยวไป

1.1.4 รอจนฝักแก่ซึ่งมีสีเหลือง ส้ม หรือน้ำตาลแก่ จึงเก็บเมล็ดไปเพาะ เมล็ดที่ได้ก่อนนำไปเพาะต้องผ่านระยะพักตัวโดยเก็บไว้ในอุณหภูมิต่ำ

1.2 ศึกษาความสามารถในการงอกของละอองเกสร

1.2.1 เก็บละอองเกสรที่แก่เต็มที่ของดอกกุหลาบทั้ง 4 พันธุ์ และดอกลูกผสม

1.2.2 นำละอองเกสรที่ได้มาเลี้ยงในอาหารแข็ง สำหรับเลี้ยงละอองเกสรที่มีระดับของปริมาณน้ำตาลซูโครสต่างกัน (ภาคผนวก)

1.2.3 บันทึกผลการงอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยสุ่มนับจำนวนละอองเกสรที่สามารถงอกท่อละอองเกสรได้ต่อจำนวนละอองเกสรที่เห็นทั้งหมด ตรวจนับละอองเกสรบนแผ่นสไลด์ แผ่นละ 5 ตำแหน่ง นำค่าที่ได้มาคำนวนเปอร์เซ็นต์ความงอกเฉลี่ย

1.3 การศึกษาการงอกของเมล็ด

เนื่องจากเมล็ดจะไม่สามารถงอกได้ทันทีที่อุณหภูมิห้องปกติ ต้องนำเมล็ดผ่านอุณหภูมิต่ำระยะเวลาหนึ่งจึง เปรียบเทียบวิธีการเพาะ 2 วิธี ดังนี้

1.3.1 เมื่อเก็บฝักแก่จากต้นแล้วนำมาใส่ถุงพลาสติกปิดปากถุงให้สนิทเก็บไว้ในอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน เมื่อครบกำหนดแกะเมล็ดออกจากฝักมาเพาะในอุณหภูมิห้องปกติวัสดุเพาะใช้พีทมอส

1.3.2 เมื่อเก็บฝักแก่จากต้นแล้ว นำมาแกะเมล็ดออกแล้วเพาะในถาดเพาะเมล็ด ใช้พีทมอสเป็นวัสดุเพาะ จากนั้นนำถาดที่เพาะเมล็ดไว้แล้วเก็บในอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส รักษาวัสดุปลูกให้ชื้นอยู่เสมอ นำต้นกล้าจากเมล็ดที่ได้จากการผสมไปปลูกทดสอบโดยใช้วัสดุปลูกคือ ขุยมะพร้าว แกลบดิบ และทราย อัตราส่วน 60 : 40 :10 และทำการบันทึกผล

1.4 ศึกษาการเจริญเติบโตของลูกผสม

1.4.1 หลังจากต้นกล้างอกได้ 1 สัปดาห์ย้ายลงในกระถางขนาด 3 x 4 นิ้ว บันทึก สีดอก จำนวนวันออกดอกแรก (นับจากวันงอก) ความยาวกิ่ง จำนวนใบ และ จำนวนกลีบดอก

1.4.2 เมื่อต้นจากเมล็ดเจริญเติบโตมีกิ่งและตาดอกที่สมบูรณ์ นำตาไปติดบนต้นตอ *Rosa multiflora* บันทึกจำนวนวันออกดอกแรก (นับจากติดตา) ความยาวกิ่ง จำนวนใบ และจำนวนกลีบดอก

1.5 การถ่ายทอดลักษณะที่ได้จากการผสมพันธุ์

ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต้นที่ได้จากการผสมตัวเองและผสมข้าม เปรียบเทียบกับต้นพ่อแม่เดิม ได้แก่ สีดอก ลักษณะดอก จำนวนกลีบดอก ลักษณะใบ จำนวนใบ ความยาวกิ่ง จำแนกสีดอกโดยใช้พัดสีของ The Royal Horticultural Society ประเทศอังกฤษ

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของรังสีเอ๊กซ์ต่อการกลายพันธุ์

2.1 ใช้กุหลาบกลุ่มสีแดง 2 พันธุ์คือ พันธุ์ Cardinal ดอกสีแดงสด (red 46 B) พันธุ์ Dallus ดอกสีแดงเข้มคล้ำ (red 45 B) นำตาบริเวณคู่ใบที่ 3 นับจากยอดลงมาซึ่งเป็นกิ่งที่ให้ดอกบานแล้วตัดเป็นท่อนให้มี 1 ตา/ท่อน หุ้มปลายทั้งสองของรอยตัดด้วยสำลีชุบน้ำเพื่อป้องกันไม่ให้รอยตัดแห้ง (ภาพที่ 3) นำไปฉายรังสีเอ๊กซ์ โดยใช้ความต่างศักย์ที่ 3 mA 70 Kv ได้อัตรารังสี (does rate) เท่ากับ 1.63 Gy/นาที (ภาพที่ 4)

ภาพที่ 3 ตากุหลาบที่เตรียมไว้เพื่อนำไปฉายรังสีเอกซ์ มีสำลีชุบน้ำ หุ้มรอยตัด เว้นพื้นที่ตา (เครื่องหมายเชือกสีแดงคือพันธุ์ Cardinal ไม่ผูกเชือกพันธุ์ Dallus)

ภาพที่ 4 ตากุหลาบในตู้ฉายรังสีเอกซ์

2.2 วางแผนการทดลองแบบ สุ่มสมบูรณ์ (complet randomized design) 8 กรรมวิธี 10 ซ้ำ ประกอบด้วย 2 ปัจจัยคือ

ปัจจัยที่ 1 พันธุ์ 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ Cardinal และ พันธุ์ Dallus

ปัจจัยที่ 2 ปริมาณรังสี 4 ระดับ คือ 0, 5, 10 และ 15 Gy

2.3 นำตาที่ฉายรังสีแล้วไปติดบนต้นตอ พันธุ์ *Rosa multiflora* ที่ชำออกรากแล้ว

2.4 บันทึกข้อมูลต้นที่อยู่รอด การเจริญเติบโต ความยาวกิ่ง จำนวนใบ การเปลี่ยนแปลงสีดอกโดยใช้พัดสีของ The Royal Horticultural Society ประเทศอังกฤษ

การทดลองที่ 3 ศึกษาจำนวนโครโมโซมของกุหลาบ

ศึกษาโครโมโซมจากเนื้อเยื่อปลายรากโดยดัดแปลงวิธีของมนต์ระวี (2544) ดังนี้

3.1 เตรียมรากโดยตัดเฉพาะส่วนปลายรากที่กำลังเจริญเติบโต เก็บตัวอย่างรากเวลา 6.30– 10.00 น

3.2 แช่ปลายรากในสารละลาย para – dichlorobenzene เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3.3 ล้างปลายรากให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปแช่ในน้ำยา acetic acid : ethanol = 1 : 3 นาน 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น

3.4 แยกเซลล์โดยการแช่ปลายรากลงในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 N เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่น

3.5 ย้อมสีเนื้อเยื่อในสีย้อม carbol fuchsin เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ขยี้เนื้อเยื่อปลายรากบนแผ่นสไลด์หยดสี lactopropionic orcein 1 หยด

3.6 นำแผ่นสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมตาเฟสที่มีโครโมโซมกระจายไม่ทับกันและจากเซลล์ที่มีผนังเซลล์ไม่แตก นับจำนวนโครโมโซมแล้วบันทึกภาพโดยกล้อง photomicroscope olypus รุ่น BHS 2 system micro scope

การทดลองที่ 4 ศึกษาความสัมพันธ์ของกุหลาบโดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีส

4.1 การสกัดเอนไซม์ใช้ใบกุหลาบคู่ที่ 3 จากปลายยอดเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพ่อ, แม่ และลูกผสมแล้วสกัดด้วย Tris 0.1 M pH 8.2 ความเข้มข้นของ stacking gel 5.0 เปอร์เซ็นต์ และ separating gel 8.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณสารสกัดเอนไซม์ที่ใช้ในการทำ อิเล็กโทรโฟรีซีส ของเอนไซม์ esterase และ peroxidase ใช้จำนวน 20 ไมโครลิตร ใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 20 mA เวลาที่ใช้ในการผ่านกระแสไฟฟ้าประมาณ 60 นาที สำหรับการย้อมสีนั้นในไอโซไซม์ esterase ใช้เวลาในการย้อมสี 30 นาที ส่วนในไอโซไซม์ peroxidase ใช้เวลาในการย้อม 20 นาที ดัดแปลงวิธีการของ มนต์ระวี (2544) (วิธีเตรียมสารแสดงในภาคผนวก)

4.2 นำใบกุหลาบหั่นเป็นชิ้นเล็กๆแล้วสกัดด้วย Tris buffer 0.1 M pH 8.2 โดยใช้ตัวอย่าง 0.5 กรัม ต่อ extraction buffer 3 มิลลิลิตร แล้วบดในโกร่งที่เก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสแล้วนำไปแยกส่วนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำ 2 ครั้ง ดูด supernatant ที่เก็บได้ในหลอด eppendrop เก็บที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส จากนั้นรอไปทำอิเล็กโทรโฟรีซีส

4.3 ประกอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซีส แล้วเติม electrode buffer ลงใน chamber

4.4 เตรียมแผ่นกระจกสำหรับใส่เจล (gel mould) แผ่นกระจกที่ใช้มี 2 แผ่นประกบกัน ขนาดของทั้ง 2 แผ่นมีความสูงไม่เท่ากัน ทำความสะอาดแผ่นกระจกโดยเช็ดด้วย acetone นำแผ่นกระจกทั้งสองมาประกบกันแล้วใช้แผ่นยางขั้นระหว่างกระจกทั้งสองข้างของแผ่นกระจกนำไปตั้งบน stand ในแนวตั้งฉากกับฐานของ stand ยึดให้แน่นด้วยตัวยึดเพื่อให้กระจกประกบกันสนิท

4.5 ใส่ running gel ที่เตรียมไว้สูงประมาณ 7 เซนติเมตร แล้วใส่น้ำกลั่นเพื่อให้ผิวหน้าของเจลเรียบ ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อรอให้เกิด polymerization ใส่ comb ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที นำ comb ออกล้างผิวหน้าเจลด้วยน้ำกลั่น

4.6 นำตัวอย่างที่เก็บไว้ในตู้แช่เย็นมาผสมกับ maker dye ใช้อัตราส่วนตัวอย่างต่อ maker dye = 9 :1 ผสมให้เข้ากัน นำมาหยอดลงบนเจลแต่ละช่อง ช่องละหนึ่งตัวอย่างจำนวน 20 ไมโครลิตร สำหรับการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ PER และ ETS ระวังอย่าให้ตัวอย่างลอยตัวขึ้นมา

4.7 ผ่านกระแสไฟ 20 mA ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ตลอดเวลาที่ผ่านกระแสจนกระทั่งระดับของ marker solution อยู่ห่างจากขอบล่างของแผ่นเจล 0.5 เซนติเมตร

4.8 แกะแผ่นกระจกที่ประกบกันออกตัดขอบล่างทางซ้ายของแผ่นเจลเพื่อให้ทราบลำดับของหมายเลขตัวอย่างที่หยอด นำเจลลงแช่ในสารละลายที่ประกอบด้วย substrate coenzyme และ dye ที่มีความจำเพาะกับเอนไซม์ที่ต้องการตรวจสอบบ่มในที่มืดพร้อมทั้งเขย่าโดยเครื่องเขย่าเพื่อให้ทำปฏิกิริยาดีขึ้น

4.9 หลังสิ้นสุดปฏิกิริยา นำแผ่นเจลล้างน้ำไหลช้าๆ แช่น้ำสารละลาย acetic acid 7 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสมด้วย glycerol 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อหยุดปฏิกิริยาและละลายสีส่วนเกินออก

4.10 บันทึกการแสดงออกของไอโซไซม์โดยการถ่ายภาพและวาดภาพไซโมแกรมแสดงตำแหน่ง จำนวน และขนาดแถบสี วัดค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของแถบสี

$$\text{ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์(Rf)} = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบสี}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของ marker solution}}$$

การทดลองที่ 5 ศึกษาการปลูกกุหลาบโดยวิธีโน้มกิ่ง

5.1 ศึกษาการปลูกโดยวิธีโน้มกิ่งในภาชนะปลูกต่างกัน

5.1.1 ใช้กุหลาบพันธุ์ตัดดอก 3 พันธุ์ได้แก่ Dallus (สีแดง) , Emblem (สีเหลือง) และ Tenike (สีขาว) โดยนำตามาติดบนต้นตอ *Rosa multiflora*

5.1.2 วางแผนการทดลองแบบ สุ่มสมบูรณ์ (complet randomized design) 9 กรรมวิธี 9 ซ้ำ ประกอบด้วย 2 ปัจจัย

ปัจจัยที่ 1 ได้แก่พันธุ์ 3 พันธุ์ คือ Dallus (สีแดง) , Emblem (สีเหลือง) และTenike (สีขาว)

ปัจจัยที่ 2 ได้แก่ วิธีการปลูกต่างกัน 3 วิธีคือ

5.1.2.1 ปลูกในตะกร้าพลาสติกขนาด 38 x 58 x 30 ซม วัสดุปลูกที่ใช้คือ ขุยมะพร้าว : แกลบดิบ : ทราย 60 เปอร์เซ็นต์ , 30 เปอร์เซ็นต์ และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

5.1.2.2 ปลูกในกระถางดินเผาขนาด 16 นิ้ว จำนวน 30 กระถาง โดยใช้วัสดุปลูกเช่นเดียวกับ 5.1.2.1

5.1.2.3 แปลงปลูกในดิน

5.1.3 เมื่อตาเจริญเติบโตทำการโน้มกิ่งเมื่อให้ดอกแรก วิธีการโน้มจะบิดม้วนลงไม่ให้เกิดรอยแผลแตก (ภาพที่ 5)

5.1.4 บันทึกข้อมูล การเจริญเติบโต การแตกกิ่ง ความยาว จำนวนกิ่ง จำนวนดอกต่อต้น และจำนวนดอกต่อต้น

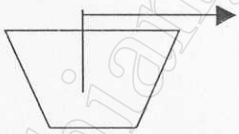
ภาพที่ 5 วิธีการโน้มกิ่ง

5.2 ศึกษาตำแหน่งโน้มที่ต่างกัน

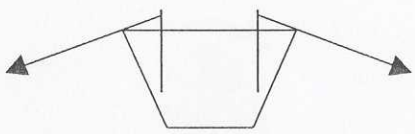
5.2.1 ใช้กุหลาบพันธุ์ Vivaldi โดยนำตามาติดบนต้นตอ *Rosa multiflora*

5.2.2 ปลูกต้นในตะกร้าพลาสติกขนาด 38 x 58 x 30 เซนติเมตร วัสดุปลูกที่ใช้คือ ขุยมะพร้าว : แกลบดิบ : ทราย อัตราส่วน 6 :3 :1 ทำการเปรียบเทียบใน 4 วิธีการ

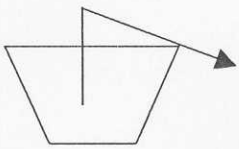
5.2.3 ทำการโน้มในตำแหน่งที่ต่างกันเมื่อตาเจริญเติบโตทำการโน้มกิ่งเมื่อให้ดอกแรก วิธีการโน้มจะบิดม้วนลงไม่ให้เกิดรอยแผลแตก



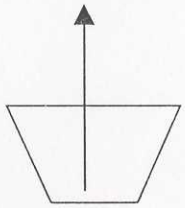
วิธีที่ 1 โน้มกิ่งราบขนานไปกับตะกร้า



วิธีที่ 2 โน้มกิ่งลงทั้ง 2 ข้างของตะกร้า



วิธีที่ 3 โน้มกิ่งลงข้างเดียวแนบตะกร้า



วิธีที่ 4 ไม่โน้มกิ่ง

ภาพที่ 6 ตำแหน่งโน้มกิ่งที่ต่างกันในแต่ละวิธี

สำหรับคุณภาพของดอกนั้นใช้มาตราฐานของมูลนิธิโครงการหลวง ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 1 คุณภาพดอกมาตราฐานมูลนิธิโครงการหลวง

เกรด	ความยาวก้าน (ซม)	เส้นผ่าศูนย์กลางดอก (ซม)
Extra	60	3.5
A	50	3.0
B	40	2.5
C	30	2.0
U (ตกเกรด)	น้อยกว่า 30	ต่ำกว่า 2.0

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

ตุลาคม 2542 – พฤษภาคม 2544

สถานที่ดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

- โรงเรือนเพาะชำ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- สถานีวิจัยโครงการหลวงอินทนนท์