บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 ช่อดอกแกลดิโอลัสพันธุ์ Diablo Fiesta Folcon Golden Age Major League Orbiter และ Vega ซึ่งตัดในระยะที่ดอกทุกดอกยังตูมอยู่ และดอกที่อยู่โคนช่อปรากฏสีของแต่ละพันธุ์แล้ว ช่อดอกแกลดิโอลัสทุกพันธุ์ตัดจากแปลงทดลองที่ศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

1.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารละลายน้ำตาล

1.2.1 น้ำตาลทรายขาว

1.2.2 8-HQS (8 – hydroxyquinoline sulfate) (บริษัท Fluka AG ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)

1.2.3 $AgNO_3$ (Silver nitrate) (บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน)

1.2.4 $Al_2(SO_4)_3.18H_2O$ (Aluminium sulfate) (บริษัท Fluka AG ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)

1.2.5 กรดซิตริก

1.2.6 BA (6- benzylamino purine) (บริษัท Fluka AG ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)

1.2.7 NAA (α - naphthaleneacetic acid) (บริษัท Fluka AG ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)

1.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในดอก

1.3.1 Anhydrous Na_2CO_3 (Sodium carbonate)

1.3.2 $C_4H_4KNaO_6.4H_2O$ (Sodium potassium tartrate)

1.3.3 $NaHCO_3$ (Sodium bicarbonate)

1.3.4 $CuSO_4.H_2O$ (Copper sulfate)

1.3.5 Anhydrous Na_2SO_4 (Sodium sulfate)

1.3.6 $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ (Ammonium molybdate)

1.3.7 กรดซัลฟูริค

1.3.8 $Na_2HAsO_4.7H_2O$ (Sodium arsenate)

1.3.9 ไนโตรเจนเหลว

1.3.10 กลูโคส

1.4 แผ่นเทียบสีของ The Royal Horticultural Society ประเทศอังกฤษ

1.5 ห้องควบคุมอุณหภูมิ 3 ห้อง คือ อุณหภูมิ 5 10 และ 15 องศาเซลเซียส

1.6 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

1.6.1 เครื่อง spectrophotometer

1.6.2 ตู้เย็นอุณหภูมิ -- 70 องศาเซลเซียส

2. วิธีการวิจัย

2.1 การทดลองที่ 1 ผลของสารละลายน้ำตาลและอุณหภูมิต่ำในการเก็บรักษาช่อดอก

การทดลองนี้เป็นการศึกษาผลของสารละลายน้ำตาลเพื่อการปรับปรุงคุณภาพในการปักแจกันควบคู่ไปกับการศึกษาผลของการเก็บรักษาช่อดอกที่ผ่านการได้รับสารละลายน้ำตาลแล้วนั้นในห้องเก็บรักษาที่มีอุณหภูมิต่ำ โดยทำการศึกษากับช่อดอกแกลดิโอลัสพันธุ์ Diablo Fiesta Folcon Golden Age Major League และ Orbiter

2.1.1 การเตรียมช่อดอกทดลอง

ตัดช่อดอกแกลดิโอลัสที่มีดอกย่อย 10-12 ดอกต่อช่อจากแปลงทดลองในระยะที่ดอกยังตูมอยู่ หลังจากที่ตัดจากแปลงตั้งช่อดอกทิ้งไว้ในที่ร่ม เมื่อช่อดอกหมดความร้อนที่ติดมาจากแปลงปลูกแล้วนำช่อดอกมาผ่านกรรมวิธีการทดลองโดยการแยกช่อดอกออกเป็น 2 กลุ่ม ตัดก้านช่อดอกให้เหลือความยาว 90 เซนติเมตร กลุ่มหนึ่งทำการ pulsing โดยการแช่โคนก้านช่อดอกในสารละลายน้ำตาล ให้สารละลายน้ำตาลท่วมก้านช่อดอก 15 เซนติเมตร แช่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อีกกลุ่มหนึ่งไม่ทำ pulsing แต่แช่โคนก้านช่อดอกในน้ำกลั่นให้น้ำท่วมโคนก้านช่อดอก 15 เซนติเมตร แช่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเช่นกัน หลังจากนั้นนำช่อดอกไปบรรจุกล่องโดยการห่อช่อดอก

ด้วยกระดาษให้หุ้มช่อดอกทั้งช่อไว้แล้วบรรจุลงกล่องกระดาษปิดฝากล่องนำไปเก็บรักษาไว้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิให้เป็น 5 10 และ 15 องศาเซลเซียส ส่วนกรรมวิธีควบคุมคือกรรมวิธีที่ใช้ช่อดอกที่ไม่ผ่าน pulsing นำไปบรรจุกล่องแล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.1.2 การเตรียมสารละลายน้ำตาล

สารละลายน้ำตาลที่ใช้ในทำการ pulsing ช่อดอกทดลอง เป็นสูตรที่ได้จากการเสนอของโสระยา (2531) ซึ่งมีส่วนผสมของ น้ำตาลทรายขาว 10 เปอร์เซ็นต์ 8-HQS 150 ส่วนต่อล้าน $Al_2(SO_4)_3.18H_2O$ 300 ส่วนต่อล้าน และ $AgNo_3$ 30 ส่วนต่อล้าน โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย

2.1.3 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) 7 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 15 ซ้ำ 1 ช่อดอกต่อซ้ำ กรรมวิธีมีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 Pulsing และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 2 ไม่ทำ pulsing และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 3 Pulsing และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 4 ไม่ทำ pulsing และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 5 Pulsing และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 6 ไม่ทำ pulsing และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 7 กรรมวิธีควบคุม

2.1.4 การบันทึกผลการทดลอง

ทำการทดสอบคุณภาพของช่อดอกในกรรมวิธีต่างๆ โดยการนำช่อดอกออกจากการเก็บรักษา ตัดโคนก้านช่อดอกทิ้งไป 20 เซนติเมตร แล้วปักก้านช่อดอกไว้ในขวดแก้วที่บรรจุน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วบันทึกคุณภาพการปักแจกันของช่อดอกในกรรมวิธีต่างๆ การนำช่อดอกออกจากห้องเย็นเพื่อการทดสอบกระทำทุก 2 วัน จนถึงวันที่ 14 ของการเก็บรักษา

บันทึกคุณภาพของช่อดอก โดยบันทึกข้อมูลดังต่อไปนี้

2.1.4.1 อายุการปักแจกัน (วัน) โดยนับจำนวนวันตั้งแต่เริ่มปักแจกันจนถึงวันหมดอายุการปักแจกัน คือ วันที่ดอกแสดงอาการเหี่ยว 50 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนดอกบานทั้งหมดในช่อ

2.1.4.2 จำนวนดอกบานต่อช่อ

2.1.4.3 จำนวนดอกที่บานในเวลาเดียวกัน โดยบันทึกในวันที่ 1 2 และ 3 ของการปักแจกัน

2.1.4.4 เส้นผ่าศูนย์กลางดอกของดอกที่ 3 นับจากโคนช่อ

2.1.4.5 การเปลี่ยนแปลงสีของดอกบาน

การบันทึกคุณภาพของช่อดอกสิ้นสุดลงเมื่อช่อดอกหมดคุณภาพในการปักแจกัน กล่าวคือ เมื่อก้านช่อดอกเหี่ยวหรือหักพับหรือเมื่อดอกย่อยเหี่ยวในขณะที่ตูมอยู่ และไม่บานในขณะปักแจกัน

2.2 การทดลองที่ 2 การปรับปรุงการบานของดอกหลังจากการเก็บรักษา

เป็นการทดลองที่สืบเนื่องมาจากการทดลองที่ 1 โดยใช้กรรมวิธีการเก็บรักษาที่ได้ผลดีที่สุดของการทดลองที่ 1 มาทดสอบกรรมวิธีการปรับปรุงการบานของดอกย่อยในช่อดอกที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำให้บานในแจกันได้เร็วขึ้นและดีขึ้น ช่อดอกที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ ช่อดอกแกลดิโอลัสพันธุ์ Vega

2.2.1 การเตรียมช่อดอกทดลอง

ทำการตัดช่อดอกวิธีการเดียวกับ ข้อ 2.1.1 นำไปทำ pulsing และเก็บรักษาในวิธีการเดียวกับกรรมวิธีที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 นำช่อดอกทดลองออกมาจากห้องเย็นแล้วให้กรรมวิธีในการปรับปรุงการบานของดอกทุกๆ 2 วัน จนถึงวันที่ 14 ของการเก็บรักษา โดยการนำช่อดอกที่เก็บรักษาไว้มาตัดก้านช่อดอกทิ้งไป 20 เซนติเมตร แล้ว แช่ก้านช่อดอกในสารละลายกรรมวิธีต่างๆ เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมซึ่งปักก้านช่อดอกไว้ในน้ำกลั่นแล้วตั้งทดสอบไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.2.2 การเตรียมสารละลายในการปรับปรุงการบานของดอก

สารละลายที่ใช้ คือ สารละลายกรดซิตริก ซึ่งมีความเข้มข้นของกรดซิตริก 3 ระดับ คือ 200 400 และ 500 ส่วนต่อล้าน สารละลาย BA ใช้ความเข้มข้นเป็น 10 และ 20 ส่วนต่อล้าน สารละลาย NAA ความเข้มข้น 10 และ 20 ส่วนต่อล้าน และสารละลายที่มีน้ำตาลเข้มข้น 2 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ 8-HQS 300 ส่วนต่อล้าน โดยมีน้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย

2.2.3 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มีจำนวนกรรมวิธี 10 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 15 ซ้ำ 1 ช่อดอกต่อซ้ำ เปรียบเทียบกับการปักก้านช่อดอกไว้ในน้ำกลั่นเป็นกรรมวิธีควบคุม กรรมวิธีมีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 สารละลายกรดซิตริก 200 ส่วนต่อล้าน ที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ขณะปักช่อดอก

กรรมวิธีที่ 2 สารละลายกรดซิตริก 400 ส่วนต่อล้าน ที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ขณะปักช่อดอก

กรรมวิธีที่ 3 สารละลายกรดซิตริก 500 ส่วนต่อล้าน ที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ขณะปักช่อดอก

กรรมวิธีที่ 4 สารละลาย BA 10 ส่วนต่อล้าน

กรรมวิธีที่ 5 สารละลาย BA 20 ส่วนต่อล้าน

กรรมวิธีที่ 6 สารละลาย NAA 10 ส่วนต่อล้าน

กรรมวิธีที่ 7 สารละลาย NAA 20 ส่วนต่อล้าน

กรรมวิธีที่ 8 สารละลายน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ 8-HQS 300 ส่วนต่อล้าน

กรรมวิธีที่ 9 สารละลายน้ำตาล 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ 8-HQS 300 ส่วนต่อล้าน

กรรมวิธีที่ 10 กรรมวิธีควบคุม

2.2.4 การบันทึกผลการทดลอง

ทำการบันทึกผลการทดลองในแต่ละกรรมวิธี เช่นเดียวกับในข้อ 2.1.4

2.3 การทดลองที่ 3 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลในกลีบดอกที่ได้รับสารละลายน้ำตาลในแจกัน

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลในดอกย่อยของช่อดอกแกลดิโอลัสที่ได้รับสารละลายน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลแตกต่างกัน โดยได้รับสารละลายน้ำตาลในลักษณะของสารละลายที่ใช้ในการปักแจกัน

2.3.1 การเตรียมช่อดอกทดลอง

ตัดช่อดอกแกลดิโอลัส พันธุ์ Golden Age ในระยะดอกตูม เช่นเดียวกับในการทดลองที่ 1 จากแปลงปลูกแล้วนำช่อดอกมาปักแจกันในขวดแก้ว ที่มีสารละลายน้ำตาลความเข้มข้น 4 ระดับ ร่วมกับ 8-HQS 150 ส่วนต่อล้าน $Al_2(SO_4)_3.18H_2O$ 300 ส่วนต่อล้าน และ $AgNO_3$ 30 ส่วนต่อล้าน แล้วทำการเก็บตัวอย่างดอก คือ ดอกที่อยู่โคนสุดของช่อ และดอกที่อยู่ปลายสุดของช่อ ไปวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์น้ำตาลในกลีบดอกทุก 2 วัน จนกว่าช่อดอกจะหมดอายุ

2.3.2 การเตรียมสารละลายน้ำตาล

สารละลายน้ำตาลที่ใช้ในการทดลองเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 4 ระดับ คือ 0 5 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์

2.3.3 การวิเคราะห์น้ำตาลในกลีบดอก

การวิเคราะห์น้ำตาลในกลีบดอกใช้วิธีการที่เสนอในคู่มือปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ (สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย , 2536) โดยมีวิธีการดังนี้

2.3.3.1 เตรียมสารละลาย copper reagent โดยมีส่วนประกอบของ anhydrous Na_2CO_3 4 กรัม $C_4H_4KNaO_6.4H_2O$ 12 กรัม $NaHCO_3$ 16 กรัม $CuSO_4.H_2O$ 4 กรัม anhydrous Na_2SO_4 180 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร และเตรียมสารละลาย color reagent ซึ่งประกอบด้วย arsenomolybdate reagent คือ $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดซัลฟูริค 21 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และละลายสาร $Na_2HAsO_4.7H_2O$ 3 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร นำสารละลายทั้ง 2 มาผสมกัน แล้วเก็บสารละลายไว้ในขวดสีน้ำตาลมีจุกแก้วเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

2.3.3.2 นำดอกย่อยที่ต้องการวิเคราะห์มาบดทั้งดอกให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว

2.3.3.3 นำตัวอย่างจาก 2.3.3.2 จำนวน 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดแก้ว เติมสาร copper reagent 2 มิลลิลิตร แล้วต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที ทำให้เย็นลงโดยเร็วในน้ำแข็งที่กำลังละลาย แล้วเติม arsenomolybdate reagent ลงไป 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที จนปรากฏสีเขียวหรือสีน้ำเงิน จึงเติมน้ำลงไป 4 มิลลิลิตร (ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 10 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากัน นำไปตรวจวัดค่า absorbance ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ OD_{520} นำค่า OD ที่วัดได้ไปเทียบกับ standard curve

2.3.4 การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกปริมาณน้ำตาลในกลีบดอก ของดอกที่อยู่โคนช่อ และดอกที่อยู่ปลายช่อ ในกรรมวิธีต่างๆจากผลของการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในรูปของซูโครสและ reducing sugar

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University