

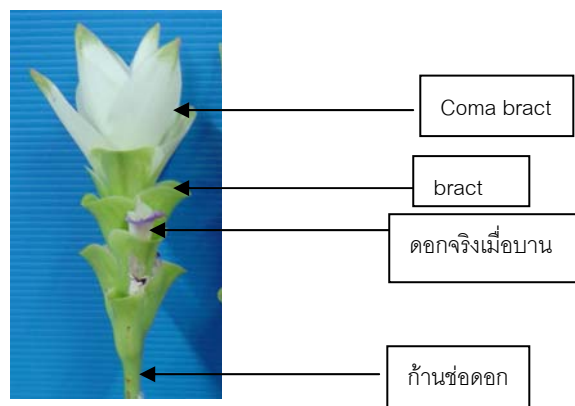
บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือและวิธีการ

3.1.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1.1 ดอกไม้ที่ใช้ทดลองได้แก่ ปทุมมาลูกผสม (*Curcuma spangnifolia*) กุหลาบ (*Rosa hybrida*) บัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaertn) คาร์เนชั่น (*Dianthus caryophyllus* L.) และ เยอบีร่า (*Gerbera jamesonii* Hook)



ภาพที่ 3.1 ปทุมมาลูกผสม (*Curcuma spangnifolia*) พันธุ์ Tropical snow

3.1.1.2 สารเคมีได้แก่ 8-hydroxyquinoline sulphate (HQS) กรดซิตริก (citric acid) น้ำตาลซูโครส (sucrose) และ N,N-Dimethylformamide (DMF)

3.1.1.3 อุปกรณ์สำหรับเตรียมสารละลายเคมี ได้แก่ บีกเกอร์ทนไฟ, กรวยแก้ว, flask กลม, แท่งแก้วคนสารละลาย, Wet and Dry Thermometer, เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้าแบบละเอียด, เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

3.1.1.4 อุปกรณ์สำหรับเก็บแก๊สเอทิลีน ได้แก่ หลอดพลาสติกสุญญากาศ โหลแก้ว และอื่น ๆ

3.1.1.5 อุปกรณ์สำหรับวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ ได้แก่ เครื่อง spectrophotometer และ water bath

3.1.1.6 อุปกรณ์สำหรับการบันทึกการดูดน้ำ เช่น หลอดพลาสติกบอกปริมาตร และ ตัวตั้งหลอดพลาสติก

3.1.1.7 อุปกรณ์สำหรับบันทึกเนื้อเยื่อ ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ แผ่น slides พร้อม cover glass มีดตัด section เนื้อเยื่อพืช

3.1.1.8 อุปกรณ์สำหรับการบันทึกผลอื่น ๆ ได้แก่ ขวดแก้วสำหรับปักแจกัน เครื่องชั่งไฟฟ้า เทอร์โมมิเตอร์ เครื่องคำนวณ กล้องบันทึกภาพ เวอร์เนียคาลิเปอร์ แผ่นเทียบสี R.H.S Colour Chart

3.2 สถานที่ดำเนินงาน

ห้องปฏิบัติการวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวไม้ตัดดอกไม้ตัดใบ ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร

3.3 ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

ทำการทดลองระหว่างเดือนมิถุนายน 2549–ตุลาคม 2549

3.4 วิธีการดำเนินงาน

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง ดังนี้

3.4.1 การทดลองที่ 1 การทดลองผลของกรดซิดริก ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพดอกและบริเวณท่อน้ำท่ออาหารของก้านช่อดอกปทุมมา กุหลาบ บัวหลวง คาร์เนชั่น และเยอบีร่า เพื่อทดสอบตามสมมุติฐานที่ตั้งไว้ว่า ภายในของก้านช่อดอกปทุมมาเมื่อได้รับสารละลายกรด จะมีลักษณะที่ไม่เหมือนกับไม้ตัดดอกโดยทั่วไป

โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD (Completely Randomized Design)

ปัจจัยที่ 1 ชนิดของดอกไม้ ได้แก่ ปทุมมา กุหลาบ บัวหลวง คาร์เนชั่น และ เยอบีร่า (A_1, A_2, A_3, A_4 และ A_5 ตามลำดับ)

ปัจจัยที่ 2 แช่ก้านดอกไม้ในน้ำกรองและสารละลายกรดซิดริกที่มีความเป็นกรด = 3 (pH = 3) (a_1 = น้ำกรอง a_2 = สารละลายกรดซิดริก)

การทดลองที่ 1 มี 10 วิธีการ ๆ ละ 3 ชั่วโมง ละ 6 ดอก

วิธีการที่ 1 A_1a_1 ดอกปทุมมาแช่ในน้ำกรอง

วิธีการที่ 2 A_1a_2 ดอกปทุมมาแช่ในสารละลายกรดซิดริก

วิธีการที่ 3 A_2a_1 ดอกกุหลาบแช่ในน้ำกรอง

วิธีการที่ 4 A_2a_2 ดอกกุหลาบแช่ในสารละลายกรดซิดริก

วิธีการที่ 5 A_3a_1 ดอกคาร์เนชั่นแช่ในน้ำกรอง

วิธีการที่ 6 A_3a_2 ดอกคาร์เนชั่นแช่ในสารละลายกรดซิดริก

- วิธีการที่ 7 A_4a_1 ดอกเยอบีร่าแช่น้ำกรอง
 วิธีการที่ 8 A_4a_2 ดอกเยอบีร่าแช่ในสารละลายกรดซัลฟริก
 วิธีการที่ 9 A_5a_1 ดอกบัวหลวงแช่น้ำกรอง
 วิธีการที่ 10 A_5a_2 ดอกบัวหลวงแช่ในสารละลายกรดซัลฟริก

ทุกวิธีการตัดก้านให้ยาวเท่ากัน แช่น้ำอุ่นอุณหภูมิเริ่มต้น 40 องศาเซลเซียส 30 นาที แล้วนำไปแช่ในสารละลายตามวิธีการข้างต้น บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของดอกและตัด cross section ศึกษาภายในก้านช่อดอก

3.4.2 การทดลองที่ 2 การทดลองหาสารละลายเคมีที่ช่วยยืดอายุดอกปทุมมา

แบ่งการทดลองเป็น 3 การทดลองย่อยดังนี้

การทดลองที่ 2.1 การทดลองใช้สารละลาย 8-hydroxyquinoline sulphate (HQS) ความเข้มข้นต่าง ๆ กับดอกปทุมมา โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD มี 6 วิธีการ ๆ ละ 3 ช่อ ๆ ละ 10 ดอก ดังนี้

วิธีการที่ 1 ทำการตัดก้านช่อดอกให้ยาว 20 เซนติเมตร แล้วแช่น้ำอุ่นอุณหภูมิเริ่มต้น 40 องศาเซลเซียส 30 นาที จากนั้นปักแจกันในน้ำกรอง (วิธีการควบคุม)

วิธีการที่ 2 – 6 เหมือนวิธีการที่ 1 แต่ปักแจกันในสารละลาย HQS ความเข้มข้น 50 100

150 200 และ 250 ppm ตามลำดับ

การทดลองที่ 2.2 การทดลองใช้น้ำตาลซูโครส ในความเข้มข้นต่าง ๆ กับดอกปทุมมา โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD มี 5 วิธีการ ๆ ละ 3 ช่อ ๆ ละ 10 ดอก ดังนี้

วิธีการที่ 1 ทำการตัดก้านช่อดอกให้ยาว 20 เซนติเมตร แล้วแช่น้ำอุ่นอุณหภูมิเริ่มต้น 40 องศาเซลเซียส 30 นาที จากนั้นปักแจกันในน้ำกรอง (วิธีการควบคุม)

วิธีการที่ 2– 5 เหมือนกับวิธีการที่ 1 แต่ปักแจกันในสารละลายน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 และ 2.0% ตามลำดับ

การทดลองที่ 2.3 นำสารละลายที่ได้ผลดีที่สุดจากวิธีการของการทดลองที่ 2.1 และ 2.2 มาผสมรวมกันแล้วปรับความเป็นกรดต่าง ๆ กัน เพื่อทดลองหาสารละลายที่มีความเป็นกรดต่าง ๆ ที่เหมาะสมสำหรับปักแจกัน โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD มี 5 วิธีการ ๆ ละ 3 ช่อ ๆ ละ 10 ดอก ดังนี้

วิธีการที่ 1 ทำการตัดก้านช่อดอกให้ยาว 20 เซนติเมตร แล้วแช่น้ำอุ่นอุณหภูมิเริ่มต้น 40 องศาเซลเซียส 30 นาที จากนั้นปักแจกันในน้ำกรอง (วิธีการควบคุม)

วิธีการที่ 2 – 5 เหมือนกับวิธีการที่ 1 แต่ปักแจกันในสารละลาย HQS ในความเข้มข้นที่ดีที่สุด จาก 2.1 + น้ำตาลซูโครส ในความเข้มข้นที่ดีที่สุดจาก 2.2 และปรับให้มี pH = 3 4 5 และ 6 ด้วยกรดซัลฟริก ตามลำดับ

3.5 การบันทึกผล

3.5.1 บันทึกขนาดของช่อดอก วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของช่อดอก และความสูงของช่อดอก ด้วยเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์

3.5.2 บันทึกน้ำหนักของช่อดอกในวันแรกและทุกวันในขณะที่ปักแจกัน ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียด 2 ตำแหน่ง

3.5.3 บันทึกความสามารถในการดูดน้ำของช่อดอกในขณะที่ปักแจกัน ด้วยการปักแจกันช่อดอกในหลอดพลาสติกที่บอกปริมาตร

3.5.4 บันทึกคุณภาพช่อดอกทั่ว ๆ ไป เช่น การเหี่ยว การร่วง

3.5.5 บันทึกสีของช่อดอกบริเวณใบประดับส่วนบน (coma bract) ด้วย R.H.S Colour Chart จากนั้นนำค่าที่ได้ไปแปลค่าจากสมุดแปลค่าสี ซึ่งมีวิธีปฏิบัติดังนี้

หลังจากอ่านค่าแผ่นเทียบสีมาตรฐานแล้ว นำค่าที่ได้ไปแปลค่าจากสมุดค่าสีในระบบ Yxy colour space อ่านค่าเป็น co-ordinates ของ x y และ z สำหรับค่า z หาได้จาก 1- x-y (Y = ความสว่าง x = แสงสีแดง y = แสงสีเขียว z = แสงสีน้ำเงิน) นำค่าที่ได้เปลี่ยนเป็นระบบ L a b colour space (เขียนจิตต์ ปียแสงทอง, มปป.)

$$L = 10 \sqrt{y} \quad [L \text{ คือ ความสว่าง มีค่า } 0 \text{ (สีดำ) } - 100 \text{ (สีขาว)}]$$

$$a = \frac{17.5 (1.02x - y)}{\sqrt{y}} \quad [a \text{ คือ ค่าสีในตำแหน่งที่อยู่บนแกน x ค่า } a (+) = \text{สีแดง } a (-) = \text{สีเขียว}]$$

$$b = \frac{7.0(y - 0.847z)}{\sqrt{y}} \quad [b \text{ คือ ค่าสีในตำแหน่งที่อยู่บนแกน y ค่า } b (+) = \text{สีเหลือง } b (-) = \text{สีน้ำเงิน}]$$

3.5.6 บันทึกปริมาณเอทิลีน ทำการบันทึกปริมาณเอทิลีนของช่อดอก ก่อนและหลังการปักแจกันครบ 2 วัน โดยนำดอกปทุมมาแต่ละช่อ (ช่อละ 2 ดอก) มาหุ้มโคนก้านดอกด้วยสำลีชุบน้ำสะอาด และหุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์อีกชั้นหนึ่ง จากนั้นบรรจุลงโหลแก้วขนาด 1,000 มิลลิลิตร จำนวน 2 ดอก แล้วปิดปากขวดด้วยแผ่นฟิล์ม และยึดติดด้วยเทปใส เมื่อครบ 1 ชั่วโมง ดูดอากาศจากโหลแก้วมา 6 มิลลิลิตร โดยฉีดใส่หลอดสูญญากาศ (Vacutainer) แล้วส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง gas chromatograph (shimadzu รุ่น GC 8A) ยังห้องปฏิบัติการต่อไป

3.5.7 บันทึกลักษณะภายในของก้านช่อดอกก่อนปักแจกันและหลังการปักแจกันครบ 2 และ 4 วันด้วยการตัด cross section

3.5.8 บันทึกอายุการปักแจกัน เมื่อช่อดอกมีการเสียหาย 50% (ลักษณะการเสียหาย เช่น การเหี่ยวของใบประดับ การปรากฏอาการดำหนิต่าง ๆ ที่ใบประดับและดอกลีบ หรืออาการอื่นที่แสดงการเสื่อมสภาพ)

3.5.9 บันทึกปริมาณคลอโรฟิลล์ ของช่อดอกปทุมมาบริเวณใบประดับส่วนบนก่อนปักแจกัน และหลังปักแจกันครบ 2 วัน วิธีการหาปริมาณคลอโรฟิลล์ดัดแปลงจาก อารดา มาสรี (2544) และ Moran and Porath (1980) มีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การสกัดคลอโรฟิลล์ด้วย N, N-Dimethylformamide (DMF)

1. นำช่อดอกปทุมมาบริเวณใบประดับบน มาตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ปริมาณ 1,000 มิลลิกรัม จากนั้นนำมาสกัดคลอโรฟิลล์ในหลอดทดลอง ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส โดยใช้สารละลาย N, N-Dimethylformamide (DMF) 7 มิลลิลิตร เป็นสารสกัด ทำการสกัดจนกระทั่งเนื้อเยื่อพืชเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีขาว

2. กรองด้วยกระดาษกรอง # 1 เพื่อแยกส่วนของกากพืชออกจากสารละลาย ทิ้งกากตัวอย่างไป

3. นำสารสกัดมาปรับปริมาตรด้วยการเติม N,N-Dimethylformamide (DMF) จนได้สารละลาย 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์ด้วย Spectrophotometer

ขั้นตอนที่ 2 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

1. นำสารละลายตัวอย่างมา centrifuge เพื่อปั่นแยกตะกอน

2. นำสารละลายที่ปั่นแยกตะกอนแล้วในข้อ 1 มาวัดค่าดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นแสง 647 และ 664 นาโนเมตร

3. นำค่าที่ได้คำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์จากสมการ

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด} = 20.27 D_{647} + 7.04 D_{664}$$

D_{647} และ D_{664} คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายคลอโรฟิลล์ในช่วงคลื่นแสง 647 และ 664 นาโนเมตร ตามลำดับ และปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด มีหน่วยเป็น ng/mg (น้ำหนักสด)

3.5.10 บันทึกอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ของห้องปฏิบัติการด้วย Wet and Dry Thermometer

3.6 วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %