บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองนี้เป็นการศึกษาการเจริญเติบโตของว่านแสงอาทิตย์ โดยศึกษาถึงวงจรการเจริญเติบโตและการเจริญเติบโตของต้น ใบ หัว และ ดอก

พืชทดลองเป็นว่านแสงอาทิตย์ที่ปลูกจากหัวที่มีขนาดแตกต่างกัน 4 ขนาด คือ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.1 – 7.0 เซนติเมตร (หัวขนาด A) , 5.1 – 6.0 เซนติเมตร (หัวขนาด B) , 4.1 – 5.0 เซนติเมตร (หัวขนาด C) และ 3.1 – 4.0 เซนติเมตร (หัวขนาด D) และหัวพันธุ์เหล่านี้ได้จาก ศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

การทดลองแบ่งออกเป็นการทดลองย่อยดังนี้

1. การทดลองที่ 1 วงจรการเจริญเติบโต

1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.1.1 หัวว่านแสงอาทิตย์ขนาด A , B , C และ D

1.1.2 ถุงดำขนาด 8 x 12 นิ้ว

1.1.3 วัสดุปลูก ได้แก่ ดิน เปลือกถั่ว และแกลบ

1.2 วิธีการทดลอง

ปลูกหัวพันธุ์ว่านแสงอาทิตย์ในถุงดำแล้วนำไปตั้งไว้ในโรงเรือนที่พรางแสง 50 เปอร์เซ็นต์ ทำการติดตามการเจริญเติบโตของช่วงการเจริญเติบโตของใบและหัว และช่วงการเจริญเติบโตของดอก

2. การทดลองที่ 2 การเจริญเติบโต

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1 หัวว่านแสงอาทิตย์ขนาด A , B , C และ D

2.1.2 ถุงดำขนาด 8 x 12 นิ้ว

2.1.3 วัสดุปลูกดังข้อ 1.1.3

2.1.4 เวอร์เนียคาลิปเปอร์

2.1.5 สายวัด

2.1.6 สลากติดชื่อ

2.1.7 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการตัดชิ้นส่วนพืชเพื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาโดยวิธี paraffin embedding

2.1.7.1 กล้องจุลทรรศน์สองตาแบบสเตอริโอ

2.1.7.2 กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

2.1.7.3 เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุน (rotary microtome) พร้อมมีด

2.1.7.4 ตู้อบที่ปรับอุณหภูมิให้เป็น 56 องศาเซลเซียส

2.1.7.5 แผ่นให้ความร้อน

2.1.7.6 กระจกสไลด์และกระจกปิดสไลด์

2.1.7.7 อุปกรณ์เครื่องแก้ว เช่น บีกเกอร์ กระบอกตวง จานแก้ว ขวดแก้วใส่น้ำยา ขวดแก้วย้อมสี และขวดแก้วสำหรับใส่ชิ้นส่วนพืช

2.1.7.8 เครื่องใช้อื่น ๆ เช่น ตะเกียงแอลกอฮอล์ ไม้ขีดไฟ พู่กัน ปากคีบ ใบมีดโกน หลอดหยด สลากติดชื่อ และกระดาษกาว

2.1.7.9 แท่งไม้ขนาด 1.5 x 1.5 x 1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่ต้มให้อิ่มตัวในพาราฟิน

2.1.8 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมชิ้นส่วนพืชและสไลด์ถาวร (Johansen,1940)

2.1.8.1 น้ำยาตรึงและรักษาสภาพเซลล์ (killing and fixing solution) ได้แก่ FAA (formalin-acetic acid-alcohol) มีส่วนผสมดังนี้

Ethyl alcohol 95 %	50 มิลลิลิตร
Acetic acid	5 มิลลิลิตร
Formalin	10 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	35 มิลลิลิตร

2.1.8.2 น้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating reagent) ประกอบด้วย ethyl alcohol 95 % , absolute alcohol , tertiary butyl alcohol (TBA) และน้ำกลั่น โดยใช้ส่วนผสมในอัตราที่แตกต่างกัน 5 ระดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตาราง 2 อัตราส่วนของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์

ระดับของน้ำยา	Ethyl alcohol 95% (มิลลิลิตร)	Ethyl alcohol 100% (มิลลิลิตร)	TBA (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
1 (50%)	40	-	10	50
2 (70%)	50	-	20	30
3 (85%)	50	-	35	15
4 (95%)	45	-	55	-
5 (100%)	-	25	75*	-

* ผสมสี erythrosin

2.1.8.3 สารตัวกลางที่ใช้ในการฝังเนื้อเยื่อ ได้แก่ Paraplast

2.1.8.4 Xylene

2.1.8.5 น้ำยายึดเนื้อเยื่อพืชให้ติดแผ่นสไลด์ (adhesive) เตรียมน้ำยา stock โดยใช้ส่วนผสมของ

ไข่ขาว 1 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น 49 มิลลิลิตร

เมื่อจะใช้นำน้ำยา stock 1 มิลลิลิตร มาเติมน้ำกลั่นให้เป็น 50 มิลลิลิตร

2.1.8.6 สีย้อม ได้แก่ Dalafield's hematoxylin ซึ่งประกอบด้วย

Ammonium aluminium sulphate (อิ่มตัวในน้ำ)	400 มิลลิลิตร
สี hematoxylin	4 กรัม
Ethyl alcohol 95 %	25 มิลลิลิตร
Glycerine	100 มิลลิลิตร
Methyl alcohol	100 มิลลิลิตร

2.1.8.7 ตัวกลางสำหรับปิดแผ่นสไลด์ (mounting media) ได้แก่ Canada balsam

2.2 วิธีการทดลอง

ปลูกหัวพันธุ์ในถุงดำ เลี้ยงไว้ในโรงเรือนที่พรางแสง 50 เปอร์เซ็นต์ แล้วบันทึกการเจริญเติบโตของดอก ใบ และหัวใหม่ ของต้นที่เติบโตจากหัวทั้ง 4 ขนาด ดังต่อไปนี้

2.2.1 การเจริญเติบโตของใบและหัว

2.2.1.1 ความยาวของใบที่ยาวที่สุด

2.2.1.2 จำนวนใบต่อต้น

2.2.1.3 ขนาดเส้นรอบวงและเส้นผ่าศูนย์กลางของหัว

การบันทึกในข้อ 2.2.1 นี้ทำทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 52 สัปดาห์ หลังจากปลูก โดยบันทึกจากต้นที่เติบโตจากหัวทั้ง 4 ขนาด ขนาดละ 10 ต้น

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design)

2.2.2 การเจริญเติบโตของดอก

การศึกษาการเจริญเติบโตของดอกเป็นการติดตามการเกิดและการพัฒนาของช่อดอกและดอกย่อย โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลง การเจริญและพัฒนาการ ของตาที่ตำแหน่งต่าง ๆ ของหัว ทำการเก็บตัวอย่างตาดังกล่าวจากหัวของต้นในช่วงต่าง ๆ ของวงจรชีวิต มาศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาเพื่อติดตามการเกิดและการเจริญและพัฒนาของดอกและช่อดอก เก็บตัวอย่างสัปดาห์ละ 5 หัว จนกระทั่งดอกบาน

การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของดอกและช่อดอก ใช้เทคนิค paraffin embedding ตามวิธีการของ Johansen (1940) โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.2.2.1 เก็บตัวอย่างชิ้นส่วนที่ต้องการศึกษาเนื้อเยื่อใส่ลงในขวดแก้วที่บรรจุน้ำยา FAA

2.2.2.2 ทำการดึงน้ำออกจากเซลล์ของเนื้อเยื่อโดยผ่านเนื้อเยื่อที่ทำการตรึงและรักษาสภาพเซลล์แล้วนั้นลงในน้ำยาที่ใช้ในการดึงน้ำออกจากเซลล์ตามลำดับ จากน้ำยาระดับที่ 1 ไปจนถึงระดับที่ 5 ของน้ำยาที่กล่าวไว้ในข้อ 2.1.8.2 หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อไปผ่าน TBA บริสุทธิ์อีก 1 ครั้ง ในแต่ละขั้นตอนใช้เวลา 6 – 12 ชั่วโมง

2.2.2.3 ทำการแทรกพาราฟินให้ซึมเข้าเนื้อเยื่อ โดยนำเนื้อเยื่อไปแช่ลงในส่วนผสมของพาราฟินเหลวและ TBA อัตราส่วน 1 : 1 แช่ทิ้งไว้ 1 คืน หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อลงแช่ในพาราฟินที่หลอมไว้ในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 2 – 3 วัน

2.2.2.4 ทำการฝังชิ้นส่วนเนื้อเยื่อใน Paraplast ในขณะที่ทำการฝังเนื้อเยื่อใช้เข็มเขี่ยหรือใบมีดลนไฟให้ร้อนไล่ฟองอากาศที่อยู่ในพาราฟินออกให้หมด พร้อมทั้งจัดเรียงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อให้อยู่ในระนาบและตำแหน่งที่ต้องการตัด

2.2.2.5 ติดแท่งพาราฟินที่ฝังเนื้อเยื่อแล้วบนแท่งไม้แล้วนำไปตัด โดยใช้เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุน ตัดเนื้อเยื่อหนา 15 – 18 ไมครอน

2.2.2.6 ติดแผ่นริบบอนเนื้อเยื่อบนแผ่นสไลด์ โดยใช้ adhesive ขณะที่ทำวางแผ่นสไลด์บนแผ่นให้ความร้อน เมื่อแผ่นริบบอนติดแน่นบนแผ่นสไลด์ดีแล้วจึงนำไปผ่าน xylene เพื่อละลายพาราฟินออกก่อนนำไปย้อมสี

2.2.2.7 ย้อมสีเนื้อเยื่อด้วยสี Dalafield's hematoxylin

2.2.2.8 ทำการปิดแผ่นสไลด์หลังจากสีย้อมแห้งแล้ว โดยใช้ Cannada balsam เป็นตัวยึดแผ่นสไลด์ถาวร

2.2.2.9 นำเนื้อเยื่อไปศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์

2.2.2.10 บันทึกภาพเนื้อเยื่อที่ทำการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์