บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 การขยายพันธุ์ว่านสี่ทิศจากเมล็ด

การทดลองนี้เป็นการศึกษาข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับการขยายพันธุ์ว่านสี่ทิศจากเมล็ด เพื่อการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านการปรับปรุงพันธุ์ว่านสี่ทิศ โดยศึกษาการเจริญเติบโตของดอกว่านสี่ทิศในระยะต่างๆ เพื่อติดตามการสร้างและการเจริญเติบโตของเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย ศึกษาความสามารถของการงอกของละอองเกสร และการเก็บรักษาละอองเกสร ตลอดจนการผสมเกสรเพื่อให้ได้เมล็ดลูกผสม โดยผสมระหว่างพันธุ์ดอกใหญ่กับพันธุ์ดอกเล็ก หลังจากนั้นศึกษาการงอกของเมล็ดและจำนวนโครโมโซมของลูกผสมที่ได้จากการผสมเกสร

1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.1.1 พืชทดลอง

ว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นบ้านดอกเล็กสีแดง (ภาพที่ 1) และพันธุ์ลูกผสมชนิดดอกใหญ่จากต่างประเทศ คือ พันธุ์ Apple Blossom (ภาพที่ 2) และพันธุ์ Orange Sovereign (ภาพที่ 3) จากศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

ภาพที่ 1 ว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นบ้านดอกเล็กสีแดง

ภาพที่ 2 ว่านสี่ทิศลูกผสมพันธุ์ Apple Blossom

ภาพที่ 3 ว่านสี่ทิศลูกผสมพันธุ์ Orange Sovereign

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

1.1.2 วัสดุและอุปกรณ์เพื่อใช้ในการปลูกพืชทดลอง

1.1.2.1 วัสดุปลูก คือ ดิน ขี้เถ้าแกลบ และเปลือกถั่ว ในอัตราส่วน 2:1:1

1.1.2.2 ถุงพลาสติกสีดำ ขนาดกว้าง 4 x 6 นิ้ว

1.1.2.3 ยากันเชื้อรา (ชื่อการค้า : Benlate OD; ชื่อสามัญ : Benomyl)

1.1.2.4 สายยางรดน้ำพร้อมฝักบัว

1.1.2.5 วัสดุอื่นๆ ได้แก่ ถุงมือยาง ป้ายกระดาษ และ ดินสอ

1.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาโดยวิธีการ paraffin embedding

1.1.3.1 ขวดพลาสติกขนาดเล็กและหลอดแก้ว (vial) สำหรับเก็บตัวอย่างพืช

1.1.3.2 ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ระดับอุณหภูมิ 56°ซ

1.1.3.3 เครื่องตัดชิ้นส่วนพืชแบบล้อหมุน (rotary microtome)

1.1.3.4 แผ่นให้ความร้อน (hot plate) สำหรับอุ่นสไลด์

1.1.3.5 กล้องจุลทรรศน์สองตาแบบสเตอริโอ (stereo microscope)

1.1.3.6 กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ (photomicroscope)

1.1.3.7 แท่งไม้ขนาด 1.5x1.5x1.5 ซม^3 ที่ผ่านการต้มให้อิ่มตัวในพาราฟิน

1.1.3.8 กระจกสไลด์พร้อมกระจกปิดสไลด์

1.1.3.9 ขวดแก้วสำหรับย้อมสี (staining jar)

1.1.3.10 อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ ตะเกียงแอลกอฮอล์ มีดผ่าตัด ปากคีบ และ เข็มเขี่ย เป็นต้น

1.1.4 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเนื้อเยื่อพืชและสไลด์ถาวร

1.1.4.1 น้ำยาสำหรับการฆ่าและรักษาสภาพเซล (killing and fixing solution) คือ FAA (formalin-acetic acid-alcohol) ซึ่งประกอบด้วยสารเคมีในอัตราส่วนดังต่อไปนี้

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

1.1.4.2 น้ำยาสำหรับดึงน้ำออกจากเซล (dehydrating solution) โดยมีส่วนผสมของ 95% ethyl alcohol, absolute ethyl alcohol, tertiary butyl alcohol (TBA) และน้ำกลั่น ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน 5 ระดับ ตามวิธีการของ Sass (1966) ดังแสดงในตารางที่ 2

1.1.4.3 พาราฟินเหลว

1.1.4.4 สารตัวกลางที่ใช้สำหรับฝังเนื้อเยื่อเพื่อการตัด (embedding media) ได้แก่ Paraplast

1.1.4.5 น้ำยาสำหรับยึดเนื้อเยื่อให้ติดบนแผ่นสไลด์ (adhesive) ได้แก่ albumin ซึ่ง stock solution ของน้ำยามีส่วนผสมดังนี้

ไข่ขาว	1	มล
น้ำกลั่น	49	มล

นำ stock solution มา 1 มล เติมน้ำกลั่นให้ครบ 50 มล แล้วจึงนำไปใช้

1.1.4.6 น้ำยาสำหรับทำให้เนื้อเยื่อใสสะอาด (clearing reagent) ได้แก่ xylol

1.1.4.7 สีสังเคราะห์สำหรับย้อมเนื้อเยื่อ คือ Delafield's hematoxylin ซึ่งประกอบด้วย

aluminium sulfate [$Al_2(SO_4)_3.16H_2O$]	400	มล
hematoxylin ($C_6H_{14}O_6$)	4	กรัม
95% ethyl alcohol	25	มล
methyl alcohol	100	มล
glycerol	100	มล

1.1.4.8 สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นสไลด์ คือ Canada balsam (Merck)

ตารางที่ 2 อัตราส่วนของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้สำหรับดึงน้ำออกจากเซล

สารเคมี	ระดับแอลกอฮอล์ (เปอร์เซ็นต์)				
	50	70	85	95	100
95% ethyl alcohol	40	50	50	45	-
absolute ethyl alcohol	-	-	-	-	25
tertiary butyl alcohol	10	20	35	55	75
น้ำกลั่น	50	30	15	-	-

1.1.5 เครื่องมือ วัสดุและอุปกรณ์ในการศึกษาการงอกและการเก็บรักษาละอองเกสร

1.1.5.1 ละอองเกสรของดอกว่านสี่ทิศ 3 พันธุ์ ในข้อ 1.1.1

1.1.5.2 กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope

1.1.5.3 ขวดบรรจุละอองเกสร

1.1.5.4 silica gel

1.1.5.5 วัสดุอื่นๆ ได้แก่ จานแก้ว กระดาษกรอง แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม สไลด์ หลอดหยด ปากคีบ และเข็มเขี่ย

1.1.6 อาหารเหลวสำหรับเลี้ยงละอองเกสรตามวิธีการของ Brewbaker and Beyong (1963) ซึ่งประกอบด้วย

stock mineral solution

H_3BO_3	0.10	กรัม
$Ca(NO_3).4H_2O$	0.30	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.20	กรัม
KNO_3	0.10	กรัม
น้ำ	100	มล

culture solution

stock mineral solution	1.0	มล
sucrose	0.2-1.0	กรัม
น้ำ	9.0	มล

1.1.7 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการศึกษาการผสมเกสร

1.1.7.1 ห้องควบคุมอุณหภูมิ 13°ซ

1.1.7.2 ถุงกระดาษเคลือบไข และคลิบหนีบกระดาษ

1.1.7.3 ปากคีบ พู่กัน ขวดบรรจุละอองเกสร ป้ายกระดาษ ลวด กรรไกร และผ้าตาข่ายบางสีขาว

1.1.7.4 วัสดุเพาะที่มีส่วนผสมของทรายและขี้เถ้าแกลบ อัตราส่วน 1:1

1.1.8 เครื่องมือ วัสดุและอุปกรณ์ในการศึกษาทางเซลวิทยา

1.1.8.1 ปลายรากของว่านสี่ทิศ 3 พันธุ์ ดังข้อ 1.1.1 และของลูกผสมที่ได้จากการผสมพันธุ์พืชทดลอง

1.1.8.2 ขวดแก้วขนาดเล็กสำหรับเก็บตัวอย่างราก

1.1.8.3 สไลด์และกระจกปิดสไลด์

1.1.8.4 เข็มเขี่ย และปากคีบ

1.1.8.5 water bath

1.1.8.6 กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope และ photomicroscope

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

1.1.9 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาทางเซลวิทยา

1.1.9.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับการหยุดวงชีพเซล (pre-treatment) ได้แก่ para - dichlorobenzene (PDB)

1.1.9.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมน้ำยาในการรักษาสภาพเซล (fixative) คือ ethyl alcohol 95 % และ glacial acetic acid ในอัตราส่วน 3:1

1.1.9.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับทำให้เซลแยกออกจากกัน (hydrolytic solution) คือ กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 1 นอร์มอล (N)

1.1.9.4 สารเคมีที่ใช้สำหรับย้อมสีโครโมโซม คือ carbol fuchsin

1.2 วิธีการวิจัย

การศึกษาทดลองแบ่งออกเป็น 5 การทดลองย่อย คือ

1.2.1 การเจริญเติบโตของเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย

การศึกษาในการทดลองนี้เป็นการศึกษาการเจริญเติบโตของดอกของพืชทดลองในระยะการเจริญเติบโตแตกต่างกัน เพื่อติดตามการสร้างและการเจริญของเกสรตัวผู้ เกสรตัวเมีย และรังไข่ในระหว่างที่หัวอยู่ในระยะพักตัว โดยศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาของดอกที่มีการเจริญเติบโตในระยะต่างๆ

วิธีการศึกษามีดังนี้

ตัดช่อดอกอ่อนในช่วงเวลาของการเจริญเติบโตของช่อดอกที่แตกต่างกันจากหัวพืชทดลอง เพื่อได้ดอกย่อยที่มีระยะการเจริญเติบโตต่างกัน ตั้งแต่ดอกขนาดเล็กที่สุดไปจนถึงดอกที่มีขนาดใหญ่ที่สุด นำดอกย่อยเหล่านั้นไปเตรียมสไลด์ถาวรเพื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาตามวิธีการ paraffin embedding ของ Johansen (1940) ติดตามการสร้างและการเจริญเติบโตของเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย โดยมีขั้นตอนของวิธีการดังต่อไปนี้

1.2.1.1 การเตรียมเนื้อเยื่อพืชตัวอย่าง ทำโดยการตัดดอกย่อยหรือส่วนประกอบของดอกที่ต้องการศึกษา นำไปแช่ในน้ำยา FAA เพื่อหยุดการทำงานของเซลและรักษาสภาพเซล

1.2.1.2 ดึงน้ำออกจากเซลของเนื้อเยื่อ ด้วยน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลทั้ง 5 ระดับ จากนั้นนำเนื้อเยื่อลงแช่ใน TBA นาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปแช่ในน้ำยาที่มีส่วนผสมของ TBA และพาราฟินเหลว ในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2.1.3 นำเนื้อเยื่อไปแช่ใน Paraplast ที่หลอมไว้ในขวดแก้วขนาดเล็ก นำไปเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 56°ซ เพื่อให้ Paraplast ซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อ เมื่อพร้อมที่จะตัดเนื้อเยื่อจึงนำไปฝังใน Paraplast เพื่อการตัดเนื้อเยื่อต่อไป

1.2.1.4 ตัดชิ้นส่วนพืชโดยใช้เครื่องตัดชิ้นส่วนพืชแบบล้อหมุน ตัดตามยาวและ/หรือตามขวางตามความเหมาะสม ให้ชิ้นส่วนมีความหนา 13-15 ไมครอน

1.2.1.5 นำชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชที่ตัดได้ มาติดบนแผ่นกระจกสไลด์ โดยใช้ albumin เป็นตัวยึดให้ติดกับสไลด์

1.2.1.6 นำชิ้นส่วนไปละลาย Paraplast ออกจากเนื้อเยื่อและทำความสะอาดเนื้อเยื่อโดยแช่ใน xylol แล้วย้อมด้วยสี Delafield's hematoxylin ปิดกระจกสไลด์โดยใช้ Canada balsam เป็นตัวยึดแผ่นปิดสไลด์ถาวร

1.2.1.7 นำเนื้อเยื่อไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆ ของดอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ตามความเหมาะสม

1.2.2 ความสมบูรณ์และความมีชีวิตของละอองเกสร

ศึกษาการงอกของละอองเกสรของดอกพืชทดลอง ดังนี้

1.2.2.1 สุ่มเก็บตัวอย่างละอองเกสรจากอับละอองเกสรของดอกที่มีอายุต่างกัน โดยเก็บละอองเกสรจากดอกที่บานแล้ว 1 วัน ซึ่งเป็นระยะที่อับละอองเกสรยังไม่แตก ดอกที่บานแล้ว 2 วัน ซึ่งเป็นดอกที่อับละอองเกสรเริ่มแตก และจากดอกที่บานแล้ว 3 วัน ซึ่งอับละอองเกสรแตกเต็มที่

1.2.2.2 นำละอองเกสรที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงละอองเกสรที่หยดบนกระจกสไลด์แผ่นละ 2 หยด

1.2.2.3 นำสไลด์ไปวางไว้ในจานแก้วที่รองพื้นด้วยกระดาษกรองชุ่มน้ำ เพื่อให้ความชื้นแก่ละอองเกสรในอาหาร โดยมีแท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมรองรับสไลด์ไว้ ปิดฝาจานแก้วและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ติดตามการงอกของละอองเกสรภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และบันทึกผลการงอกของละอองเกสร

1.2.3 การเก็บรักษาละอองเกสร

1.2.3.1 เก็บละอองเกสรของพืชทดลองจากอับละอองเกสรที่มีระยะการเจริญเติบโตต่างกัน เช่นเดียวกับในข้อ 1.2.2.1 หลังจากเก็บแล้วแบ่งใส่ขวดสำหรับเก็บละอองเกสร ปิดฝาให้แน่นเพื่อป้องกันการปนเปื้อน แล้วนำไปเก็บรักษาในสภาพที่แตกต่างกันคือ

สภาพที่ 1 ปิดฝาขวดและเก็บในขวดใหญ่ที่ภายในบรรจุผลึก silica gel เก็บภายใต้สภาพอุณหภูมิห้อง (25-28°ซ)

สภาพที่ 2 ปิดฝาขวดและเก็บในขวดใหญ่ที่ภายในบรรจุผลึก silica gel เก็บภายใต้สภาพอุณหภูมิ 5°ซ

1.2.3.2 สุ่มละอองเกสรมาทดสอบความงอก เมื่อเก็บรักษาไว้เป็นเวลานาน 0, 1, 3, 6, 10, 15, 21, 28, 36, 45, 55, 66, 78, 91, 105 และ 120 วัน ตามลำดับ โดยสุ่มละอองเกสรมาเลี้ยงในหยดอาหารบนสไลด์ นำสไลด์วางไว้ในจานแก้วเช่นเดียวกับที่ปฏิบัติใน 1.2.2.3 แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงนำสไลด์ออกมาตรวจนับการงอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์

1.2.3.3 การบันทึกข้อมูล

จากหยดอาหาร 2 หยดต่อสไลด์ต่อพันธุ์ต่อระยะการพัฒนาของอับละอองเกสร สุ่มนับจำนวนละอองเกสรที่สามารถงอกท่อละอองเกสรได้ต่อจำนวนละอองเกสรที่เห็นทั้งหมดหยดละ 5 ตำแหน่ง นำค่าที่ได้มาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความงอกเฉลี่ย

1.2.4 การผสมเกสร

เตรียมต้นพืชทดลองโดยการนำหัวพืชทดลองทั้ง 3 พันธุ์ แช่ยากันราแล้วผึ่งให้แห้ง นำไปเก็บไว้ในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 13°ซ เป็นเวลานาน 6 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดเวลานำออกมาปลูกในถุงดำที่บรรจุวัสดุปลูก แล้วนำไปปลูกเลี้ยงในโรงเรือนที่กรองแสง

1.2.4.1 การเตรียมดอกของต้นที่ใช้เป็นต้นแม่

เลือกดอกที่อยู่ในระยะดอกตูม ทำหมันดอก (emasculation) โดยใช้กรรไกรตัดกลีบดอกและเกสรตัวผู้ออกเหลือส่วนของยอดเกสรตัวเมียและรังไข่ให้ติดอยู่กับดอก จากนั้นคลุมดอกที่ทำหมันแล้วด้วยถุงกระดาษเคลือบไขและติดคลิบหนีบกระดาษเพื่อป้องกันการผสมจากละอองเกสรที่ปลิวมากับอากาศหรือติดมากับแมลง เมื่อดอกพร้อมผสมจะสังเกตได้จากยอดเกสรตัวเมีย ซึ่งจะแผ่ตัวออกและมีเมือกใสเหนียวคลุมอยู่

1.2.4.2 การเตรียมละอองเกสร

นำต้นที่ใช้เป็นต้นพ่อไปไว้ในมุ้งตาข่ายสีขาว โดยใช้ต้นที่มีดอกอยู่ในระยะดอกตูมหรือระยะก่อนบาน 1 หรือ 2 วัน ใช้มุ้งตาข่าย 1 มุ้งต่อ 1 พันธุ์ เพื่อป้องกันการฟุ้งกระจายของละอองเกสรข้ามพันธุ์ หลังจากดอกบานแล้ว 1-2 วัน อับละอองเกสรของดอกจะแตกออกให้ละอองเกสรเป็นผงสีเหลือง ซึ่งเป็นระยะที่ละอองเกสรแก่พร้อมที่จะนำไปผสมเกสรกับดอกของต้นแม่

1.2.4.3 การผสมเกสร

หลังจากเกสรตัวเมียของดอกว่านสี่ทิศที่ใช้เป็นแม่พร้อมที่จะผสมแล้ว นำละอองเกสรที่เตรียมไว้มาผสมแบบสลับพ่อสลับแม่ รวมทั้งการผสมตัวเองและผสมข้ามต้นในแต่ละพันธุ์ด้วยวิธีผสมด้วยมือ โดยใช้พู่กันขนาดเล็กแตะละอองเกสรจากดอกที่ต้องการมาแตะบน

ยอดเกสรตัวเมียอีกดอกหนึ่ง จากนั้นจึงคลุมดอกไว้ตามเดิมด้วยถุงกระดาษเคลือบไข พร้อมกับเขียนป้ายติดบอกชื่อคู่ผสมและวันที่ผสม ช่วงเวลาการผสมเกสรคือ 08.00-10.00 น จับคู่ผสมเกสรดังนี้

คู่ที่ 1	R ⊗	คู่ที่ 6	P x P
คู่ที่ 2	R x R	คู่ที่ 7	P x R
คู่ที่ 3	R x P	คู่ที่ 8	O ⊗
คู่ที่ 4	R x O	คู่ที่ 9	O x O
คู่ที่ 5	P ⊗	คู่ที่ 10	O x R

หมายเหตุ : R = พันธุ์พื้นบ้านดอกสีแดง

P = พันธุ์ Apple Blossom

O = พันธุ์ Orange Sovereign

1.2.4.4 การพัฒนาของรังไข่

ติดตามการเจริญเติบโตของรังไข่ของดอกที่ได้รับการผสม โดยการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา ดังข้อ 1.2.1 และถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์

1.2.4.5 การเพาะเมล็ด

เพาะเมล็ดจากฝักแก่โดยแกะเอาเมล็ดออกไปเพาะในวัสดุเพาะที่มีส่วนผสมของทรายหยาบและขี้เถ้าแกลบในอัตราส่วน 1:1 หว่านเมล็ดในร่องลึก 1.0 ซม กลบด้วยวัสดุเพาะบางๆ พอมิดเมล็ด รดน้ำให้เปียกทั่วถึง ตั้งไว้ในที่ร่ม และติดตามการเจริญเติบโตของเมล็ด

1.2.4.6 การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลดังต่อไปนี้

1.2.4.6.1 จำนวนดอกที่ผสม จำนวนฝักที่ได้จากการผสมในแต่ละคู่ผสม จำนวนฝักที่สมบูรณ์และจำนวนฝักที่ฝ่อ

1.2.4.6.2 ระยะเวลาตั้งแต่ผสมจนถึงเมล็ดแก่

1.2.4.6.3 จำนวนเมล็ดที่ได้

1.2.4.6.4 ระยะเวลาในการงอกและเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด

1.2.4.6.5 จำนวนต้นลูกผสมที่ได้

1.2.5 การศึกษาทางเซลวิทยาของลูกผสมที่ได้จากการผสมพันธุ์

ศึกษาโครโมโซมจากเนื้อเยื่อปลายรากของพ่อแม่พันธุ์และของลูกผสม โดยวิธีการของ Feulgen and Rossenback ที่ทำการศึกษาไว้ในปี 1924 ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีชื่อว่า Feulgen squash method (ภูวดล, 2528; Dyer,1979) โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1.2.5.1 เตรียมรากพืช โดยนำหัวของพ่อแม่พันธุ์และหัวของต้นที่เติบโตจากเมล็ดของลูกผสมมาตัดรากเก่าทิ้งแล้วนำไปชำในกระบะที่บรรจุวัสดุเพาะ หลังจากนั้น 5-7 วัน รากจะงอกออกมาจากฐานของหัว

1.2.5.2 เก็บตัวอย่างรากในเวลา 09.30-10.00 น โดยเลือกรากที่มีความยาว 3-5 มิลลิเมตร (มม) ใช้รากที่ปลายมีสีขาวขุ่น

1.2.5.3 หยุดวงชีพของเซล โดยนำปลายรากที่ได้มาแช่ในสารละลาย PDB ที่อิ่มตัวในน้ำเป็นเวลานาน 24-48 ชั่วโมง

1.2.5.4 รักษาสภาพเซล โดยนำรากที่แช่ในสารละลาย PDB ออกมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลนาน 5 นาที แล้วล้างรากให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น

1.2.5.5 แยกเซล โดยการแช่รากลงใน HCl เข้มข้น 1 N ที่อุณหภูมิ 60°ซ เป็นเวลานาน 5 นาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น

1.2.5.6 ย้อมสีเนื้อเยื่อใน carbol fuchsin เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง

1.2.5.7 นำปลายรากที่ผ่านการย้อมสีแล้ววางบนแผ่นสไลด์ ขยี้ปลายรากด้วยเข็มเขี่ยแล้วหยดสี carbol fuchsin 1 หยด ตรงบริเวณที่มีปลายราก ใช้เข็มเขี่ยเคาะเนื้อเยื่อปลายรากให้เซลกระจาย ใช้ปากคีบคีบส่วนของรากที่ไม่ต้องการออก แล้วปิดแผ่นกระจกปิดสไลด์บนบริเวณที่มีเนื้อเยื่อ ใช้กระดาษซับวางบนแผ่นสไลด์แล้วกดแผ่นกระจกปิดสไลด์เพื่อให้เซลกระจายซับสีที่มากเกินไปออก

1.2.5.8 นำแผ่นสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เลือกเซลที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมตาเฟส และเป็นเซลที่มีการกระจายตัวของโครโมโซม นับจำนวนโครโมโซมแล้วบันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การทดลองที่ 2 การขยายพันธุ์ว่านสี่ทิศจากหัว

การศึกษานี้เป็นการศึกษาความสามารถในการขยายพันธุ์ว่านสี่ทิศจากหัวและช่วงเวลาที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์ โดยการผ่าหัวออกเป็นชิ้นแบบ bulb cutting

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1 หัวว่านสี่ทิศพันธุ์ Apple Blossom ที่มีขนาดเส้นรอบวง 4 ขนาด คือ ขนาด A, B, C และ D ซึ่งมีเส้นรอบวงของหัวเป็น 16.1-18.0 , 14.1-16.0 , 12.1-14.0 และ 10.1-12.0 ซม ตามลำดับ

2.1.2 วัสดุชำ คือ ทราย ขี้เถ้าแกลบ และขุยมะพร้าว ในอัตราส่วน 1:1:1

2.1.3 วัสดุปลูก คือ ดิน ขี้เถ้าแกลบ และเปลือกถั่ว ในอัตราส่วน 2:1:1

2.1.4 กระบะพลาสติก

2.1.5 ถุงพลาสติกสีดำ ขนาด 2.5 x 6 นิ้ว

2.1.6 ยากันเชื้อรา คือ Benlate OD

2.1.7 ปุ๋ยเคมีกาวิโอต้า 63 สูตร 18-18-18

2.1.8 สายยางรดน้ำพร้อมฝักบัว

2.1.9 อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ มีด ถุงมือยาง ป้ายกระดาษ ดินสอ เวอร์เนียคาลิปเปอร์ และเครื่องชั่งไฟฟ้า

2.2 วิธีการวิจัย

นำหัวว่านสี่ทิศดังข้อ 2.1.1 มาผ่าแบบ bulb cutting โดยผ่าหัวตามยาวให้ผ่านจุดศูนย์กลางของหัวให้ได้ชิ้นส่วนจากการผ่าเป็น 4, 8 และ 16 ชิ้น ใช้หัว 4 ขนาดดังข้อ 2.1.1 ผ่าหัวทุกๆ 4 สัปดาห์ ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ 2541 จนถึงเดือน มกราคม 2542 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) จำนวน 7 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 1 หัว

นำชิ้นส่วนที่ผ่าแล้วไปชำในกระบะที่บรรจุวัสดุชำ วางกระบะไว้ภายใต้โรงเรือนที่พรางแสง 50% เมื่อชิ้นส่วนของหัวสร้างหัวย่อย และหัวย่อยงอกเป็นต้นกล้าขึ้นมาจนมีความแข็งแรงเพียงพอจึงย้ายลงปลูกในถุงดำ ให้ปุ๋ยสูตร 18-18-18 หลังจากย้ายปลูกทุกๆ 2 สัปดาห์ เก็บเกี่ยวหัวเมื่อครบระยะเวลา 5 เดือน หลังจากที่ทำการผ่าหัวในแต่ละเดือน

2.3 การบันทึกข้อมูล

2.3.1 วันที่ต้นอ่อนเริ่มงอกออกมาจากชิ้นส่วนของหัวที่นำไปชำ

2.3.2 จำนวนวันนับจากการชำชิ้นส่วนหัวจนถึงวันที่ย้ายลงปลูกในถุง

2.3.3 จำนวน ขนาด และน้ำหนักของหัวใหม่ที่ได้จากการขยายพันธุ์โดยการตัดแบ่งในแต่ละกรรมวิธี

สถานที่ทำการวิจัย

แปลงทดลองของศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่ฯ

ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

เริ่มทำการวิจัย เดือน มกราคม 2541 สิ้นสุดการวิจัย เดือน กรกฎาคม 2542

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University