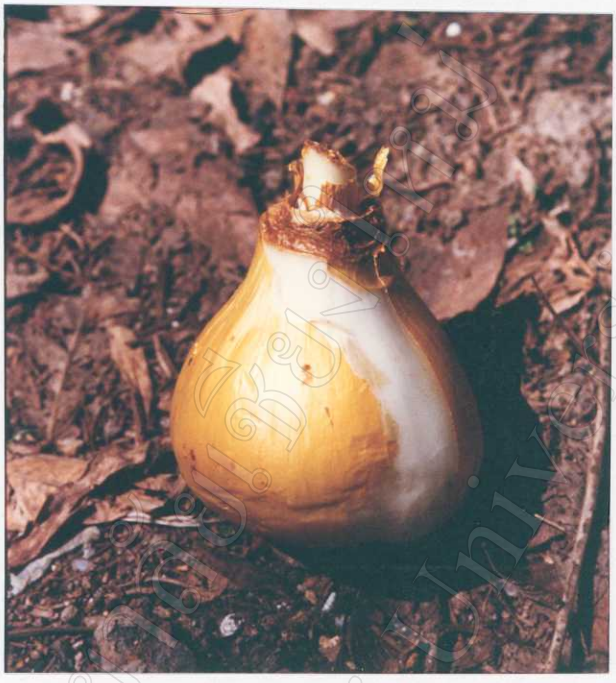
บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 พืชทดลอง คือ ว่านนางคุ้ม (ภาพที่ 1) หัวพันธุ์ว่านนางคุ้มที่ใช้ทดลองมีเส้นรอบวง 16 - 20 ซม (ภาพที่ 2) ได้จากศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

ภาพที่ 1 ว่านนางคุ้ม



ภาพที่ 2 หัวพันธุ์ว่านนางคุ้มขนาด 16 – 20 ซม

1.2 ถุงดำขนาด 8×10 นิ้ว

1.3 วัสดุปลูก คือ ดิน เปลือกถั่วและขี้เถ้าแกลบ ในอัตราส่วน 2 : 1 : 1

1.4 หลอดแก้วสำหรับเก็บตัวอย่างพืช

1.5 เครื่องตัดชิ้นส่วนพืชแบบล้อหมุน (rotary microtome)

1.6 แผ่นให้ความร้อน (hot plate)

1.7 ตู้อบที่ปรับอุณหภูมิเป็น 56 °ซ

1.8 กระจกสไลด์ (slide) และกระจกปิดสไลด์ (cover slip)

1.9 อุปกรณ์เครื่องแก้ว คือ ขวดแก้วสำหรับย้อมสี (staining jar) บีกเกอร์ กระบอกตวง และขวดแก้ว

1.10 กล้องจุลทรรศน์แบบสองตา

1.11 กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

1.12 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาเนื้อเยื่อ

1.12.1 น้ำยาที่ใช้ในการรักษาสภาพเซล คือ FAA (formalin – acetic acid – alcohol) ซึ่งมีส่วนผสมของสารเคมีดังนี้

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

1.12.2 น้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซล (dehydrating solution) ประกอบด้วย ethyl alcohol (95%) absolute alcohol tertiary butyl alcohol (TBA) และน้ำกลั่น โดยใช้ส่วนผสมของสารเคมีในอัตราแตกต่างกัน 5 ระดับ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 อัตราส่วนของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซล

ระดับของน้ำยา	น้ำกลั่น (มล)	ethyl alcohol 95% (มล)	TBA (มล)	absolute alcohol (มล)
50%	50	40	10	-
70%	30	50	20	-
85%	15	50	35	-
95%	-	45	55	-
100%	-	-	75	25

1.12.3 พาราฟินเหลว

1.12.4 สารตัวกลางที่ใช้ในการฝังเนื้อเยื่อพืช (embedding media) ได้แก่ Paraplast

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

1.12.5 น้ำยายึดเนื้อเยื่อพืชให้ติดกับสไลด์ (adhesive) คือ albumin ซึ่งเตรียมน้ำยา stock โดยใช้ส่วนผสมดังนี้

ไข่ขาว	1	มล
น้ำกลั่น	45	มล

เมื่อจะใช้นำน้ำยา stock 1 มล มาเติมน้ำกลั่นให้เป็น 50 มล

1.12.6 น้ำยาสำหรับทำให้เนื้อเยื่อสะอาด ได้แก่ xylol

1.12.7 สีสังเคราะห์สำหรับย้อมเนื้อเยื่อ คือ Dalafield's hematoxylin ซึ่งประกอบด้วย

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

1.12.8 ตัวกลางสำหรับปิดแผ่นสไลด์ คือ Canada balsam (Merck)

1.13 อุปกรณ์สำหรับศึกษาการงอกของละอองเกสร คือ จานแก้ว ขวดบรรจุละอองเกสร กระดาษกรอง แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม ปากคีบ และเข็มเขี่ย

1.14 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
น้ำกลั่น	100	มล

culture solution

stock mineral solution	1.0	มล
sucrose	0.1-0.5	กรัม
น้ำกลั่น	9.0	มล

1.15 วัสดุอื่นๆ ได้แก่ มีดผ่าตัด เวอร์เนียคาลิปเปอร์ สายวัด แท่งไม้ กรรไกร พู่กัน ลวด กระดาษเคลือบไข และด้ายสี

2. วิธีการ

การศึกษาแบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือ

2.1 การทดลองที่ 1 การเจริญเติบโตของดอกว่านนางคุ้ม

การทดลองนี้เป็นการศึกษาการเจริญเติบโตของดอกว่านนางคุ้มที่เจริญเติบโตจากหัวที่มีขนาดเส้นรอบวง 16 – 20 ซม ซึ่งปลูกเลี้ยงภายใต้โรงเรือนพรางแสง โดยการติดตามการเจริญเติบโตทางใบและการเริ่มสร้างดอกตลอดจนการเจริญเติบโตของดอกตลอดวงจรชีวิตของต้น วิธีการทดลองมีดังนี้

2.1.1 เตรียมพืชทดลองโดยการปลูกหัวว่านนางคุ้มในถุงดำแล้วเลี้ยงไว้ภายใต้โรงเรือนพรางแสงซึ่งพรางแสงให้เป็นประมาณ 50 % ของสภาพธรรมชาติ และเมื่อต้นเข้าระยะพักตัวและส่วนที่อยู่เหนือดินตลอดจนรากแห้งตายไปแล้ว จึงเก็บเกี่ยวหัวขึ้นมาจากเครื่องปลูกแล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าหัวจะหมดระยะพักตัว

2.1.2 สุ่มตัวอย่างต้นว่านนางคุ้มที่ปลูกเลี้ยงไว้มาศึกษาสัณฐานของปลายยอดตั้งแต่วันที่ปลูกไปจนกระทั่งต้นมีการเจริญเติบโตครบวงจรชีวิต โดยสุ่มต้นพืชมาศึกษาสัปดาห์ละ 5 ต้น

2.1.3 ศึกษาสัณฐานของปลายยอด โดยการแกะกาบใบที่ประกอบกันเป็นหัวออก จนกระทั่งถึงปลายยอดเพื่อสังเกตและบันทึกลักษณะของตายอดและตาข้าง รวมถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระยะที่มีการเริ่มสร้างตาดอก สำหรับปลายยอดที่มีขนาดเล็กและสังเกตด้วยตาเปล่าไม่ได้นั้นเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อปลายยอดและเนื้อเยื่อบริเวณที่มีตาข้างแช่ในน้ำยา FAA แล้วนำเนื้อเยื่อดังกล่าวไปผ่านขั้นตอนของการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อเตรียมสไลด์ถาวรโดยวิธี paraffin embedding ของ Johansen (1940) โดยมีขั้นตอนของวิธีการดังนี้

2.1.3.1 นำเนื้อเยื่อพืชที่แช่ในน้ำยา FAA แล้วอย่างน้อย 24 ชั่วโมงขึ้นไป ผ่านขั้นตอนของการดึงน้ำออกจากเซลของเนื้อเยื่อด้วยน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซล 5 ระดับดังแสดงในตารางที่ 1 ขั้นตอนละ 6 – 12 ชั่วโมง แล้วนำเนื้อเยื่อแช่ใน TBA นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแช่ในน้ำยาที่มีส่วนผสมของ TBA และพาราฟินเหลว ในอัตราส่วน 1 : 1 นาน 24 ชั่วโมงหรือนานกว่านั้น

2.1.3.2 นำเนื้อเยื่อจาก 2.1.3.1 ไปแช่ใน Paraplast ที่หลอมละลายแล้วเก็บเนื้อเยื่อดังกล่าวไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 56° ซ เมื่อ Paraplast ซึมเข้าเนื้อเยื่อทั่วถึงแล้วนำเนื้อเยื่อไปฝังใน Paraplast แล้วติดลงบนแท่งไม้เพื่อการตัดเนื้อเยื่อในขั้นต่อไป

2.1.3.3 ตัดชิ้นเนื้อเยื่อพืชโดยใช้เครื่องตัดชิ้นส่วนพืชแบบล้อหมุน ตัดตามยาวและตามขวาง โดยให้ชิ้นส่วนที่ตัดมีความหนา 13 ไมครอน

2.1.3.4 นำชิ้นส่วนที่ตัดได้มาติดบนแผ่นกระจกสไลด์ โดยใช้ albumin เป็นตัวยึดให้เนื้อเยื่อติดกับกระจกสไลด์ แล้วอุ่นสไลด์บนแผ่นให้ความร้อน

2.1.3.5 นำชิ้นส่วนที่ติดบนแผ่นกระจกสไลด์ไปละลายพาราฟินออก โดยแช่ใน xylol แล้วนำเนื้อเยื่อไปย้อมด้วยสี Dalafield's hematoxylin หลังจากนั้นติดกระจกปิดสไลด์โดยใช้ Canada balsam เป็นตัวยึด

2.1.3.6 นำเนื้อเยื่อในสไลด์ถาวรไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพ

2.1.4 บันทึกผลดังต่อไปนี้

2.1.4.1 การเจริญเติบโตทางใบของต้นในวงจรการเจริญเติบโต 1 วงจร ในลักษณะของจำนวนใบต่อต้น ความยาวของใบที่ยาวที่สุดวัดจากโคนใบจนถึงปลายใบ และการเปลี่ยนแปลงของขนาดเส้นรอบวงของหัว

2.1.4.2 การเจริญเติบโตทางดอกในลักษณะของการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของปลายยอด การเริ่มกำเนิดช่อดอกและดอกย่อย และขั้นตอนในการสร้างและการเจริญเติบโตของช่อดอกและดอกย่อยจนเป็นช่อดอกที่สมบูรณ์โดยการวาดรูปลายเส้น และบันทึกภาพถ่ายของเนื้อเยื่อใต้กล้องจุลทรรศน์

2.2 การทดลองที่ 2 การเจริญเติบโตของเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียของดอกว่านนางคุ้มและการผสมเกสร

การทดลองนี้แบ่งเป็น 2 การทดลองย่อย คือ

2.2.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาการเจริญเติบโตของดอกว่านนางคุ้มในระยะการเจริญเติบโตต่างกัน เพื่อติดตามดูการสร้างและการเจริญเติบโตของเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย มีวิธีการศึกษาดังนี้

2.2.1.1 ตัดช่อดอกอ่อนที่อยู่ภายในหัวในช่วงที่ช่อดอกกำลังมีการเจริญเติบโต โดยเก็บให้ได้ช่อดอกที่มีระยะการเจริญเติบโตแตกต่างกัน เพื่อให้ได้ดอกย่อยที่มีระยะของการเจริญเติบโตต่างกันตั้งแต่ดอกขนาดเล็กที่สุดไปจนถึงดอกที่มีขนาดใหญ่ที่สุด

2.2.1.2 นำดอกย่อยที่มีระยะการเจริญเติบโตต่างกันนั้นไปเตรียมสไลด์ถาวรเพื่อการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาตามวิธีการข้อ 2.1.3 และบันทึกภาพเนื้อเยื่อของอับละอองเกสรและรังไข่ของดอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.2.2 การผสมเกสร

การศึกษานี้ศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการผสมเกสรทั้งในแบบผสมในช่อเดียวกันและผสมข้ามช่อดอก ติดตามการเปลี่ยนแปลงของรังไข่ภายหลังการผสมเกสรตลอดจนการติดเมล็ด พร้อมทั้งศึกษาระยะพร้อมผสมของเกสรทั้งสองชนิด

2.2.2.1 ศึกษาระยะพร้อมผสมเกสรของดอกโดยบันทึกช่วงเวลาที่อับละอองเกสรแตกแล้วปลดปล่อยละอองเกสร และช่วงเวลาที่ปลายยอดเกสรตัวเมียพร้อมผสมเกสร โดยสังเกตจากการที่ปลายยอดเกสรตัวเมียมีน้ำเหนียวคลุม

2.2.2.2 ศึกษาความสมบูรณ์และความมีชีวิตของละอองเกสร โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างละอองเกสรจากอับละอองเกสรของดอก โดยเก็บละอองเกสรจากดอกที่บานได้ 1 วัน ซึ่งมีอับละอองเกสรที่ยังไม่แตก และดอกที่บานได้ 3 วัน ซึ่งมีอับละอองเกสรที่แตกแล้ว แล้วนำละอองเกสรมาศึกษาความสามารถในการงอก โดยเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงละอองเกสรที่หยดลงบนแผ่นสไลด์แผ่นละ 2 หยด นำแผ่นสไลด์ไปวางในจานแก้วที่รองพื้นด้วยกระดาษกรองชุ่มน้ำเพื่อให้ความชื้น โดยมีแท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมรองรับแผ่นสไลด์ไว้ ปิดฝาจานแก้วและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ติดตามการงอกของละอองเกสรภายใต้กล้องจุลทรรศน์บันทึกผลการงอกของละอองเกสร

2.2.2.3 ศึกษาการเก็บรักษาละอองเกสร โดยเก็บละอองเกสรจากอับละอองเกสรของดอกที่มีระยะการเจริญเติบโตต่างกัน เช่นเดียวกับในข้อ 2.2.2.2 มาใส่ในขวดสำหรับเก็บละอองเกสรปิดฝาให้แน่นด้วยเทป เพื่อป้องกันการปนเปื้อน แล้วนำไปเก็บรักษาในสภาพที่แตกต่างกันคือ เก็บภายใต้สภาพอุณหภูมิห้อง (25 – 28 °ซ) หรือเก็บภายใต้สภาพอุณหภูมิ 5 °ซ หลังจากนั้นสุ่มละอองเกสรมาทดสอบความงอก เมื่อเก็บรักษาไว้เป็นเวลานาน 0 1 3 6 10 15 21 และ 28 วัน ใช้วิธีการเลี้ยงละอองเกสรในอาหารเหลวตามวิธีการเดียวกับที่ระบุในข้อ 2.2.2.2 เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำสไลด์ออกมาตรวจนับการงอกของละอองเกสรใต้กล้องจุลทรรศน์ สุ่มนับจำนวนละอองเกสรที่สามารถงอกท่อละอองเกสรและคำนวนเปอร์เซ็นต์ความงอก

2.2.2.4 การผสมเกสร

เตรียมต้นพืชทดลองโดยปลูกเลี้ยงในวิธีเดียวกันกับ 2.1.1 เพื่อให้ได้ต้นที่มีช่อดอกเพื่อการผสมเกสร

2.2.2.4.1 เตรียมดอกของต้นที่ใช้เป็นต้นแม่โดยเลือกดอกตูมเพื่อทำหมันดอก (emasculation) โดยการตัดกลีบดอกและเกสรตัวผู้ออกให้หมดเหลือแต่เพียงเกสรตัวเมีย จากนั้นคลุมดอกด้วยถุงกระดาษเคลือบไข แล้วมัดปากถุงด้วยลวดเพื่อป้องกันการผสมเกสรจากละอองเกสรที่อาจจะปลิวมากับลมหรือมากับแมลง เมื่อดอกพร้อมผสมซึ่งสังเกตได้จากปลายยอดของเกสรตัวเมียที่แผ่ออกและมีน้ำเหนียวคลุม

2.2.2.4.2 เตรียมละอองเกสร โดยคลุมดอกของต้นที่ใช้เป็นต้นพ่อไว้ เพื่อป้องกันการฟุ้งกระจายของละอองเกสร หลังจากดอกบานแล้ว 3 วัน อับละอองเกสรจะแตกออกเห็นละอองเกสรเป็นผงสีเหลือง ซึ่งเป็นระยะที่ละอองเกสรแก่และพร้อมสำหรับการผสมเกสร

2.2.2.4.3 ผสมเกสรด้วยมือ ผสมดอกทั้งแบบผสมตัวเองและผสมข้ามดอกภายในช่อเดียวกัน และแบบข้ามช่อดอก เวลาที่ทำการผสมคือ 7.00 น และ 9.00 น วิธีการผสมคือ ใช้พู่กันแตะละอองเกสรมาป้ายไว้บนปลายยอดของเกสรตัวเมีย จากนั้นคลุมดอกที่ผสมแล้วด้วยถุงกระดาษดังเดิม แกะถุงกระดาษออกหลังจากผสมได้ 3 วัน ผสมเกสรทั้งหมดวิธีละ 25 ต้น ต้นละ 12 ดอกต่อช่อ

2.2.2.4.4 ติดตามการเจริญเติบโตของรังไข่ของดอกที่ได้รับการผสม โดยบันทึกการเปลี่ยนแปลงของขนาดของรังไข่ในระยะที่สามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงของขนาดของรังไข่ได้ด้วยตาเปล่า ส่วนในระยะที่สังเกตไม่เห็นนั้นเก็บตัวอย่างรังไข่เพื่อศึกษาเนื้อเยื่อตามวิธีการที่ระบุไว้ในข้อ 2.1.3

2.2.2.4.5 บันทึกผลการผสมเกสรในลักษณะของจำนวนดอกที่ผสมติดในแต่ละกรรมวิธี และระยะเวลาตั้งแต่ผสมจนฝักแก่

2.2.2.5 การเพาะเมล็ด เก็บเมล็ดจากฝักที่ติดเมล็ดเมื่อฝักแก่เต็มที่แล้วนำเมล็ดไปเพาะในกระบะที่มีเครื่องปลูกที่มีส่วนผสมของ ทราย ขี้เถ้าแกลบ และขุยมะพร้าวในอัตราส่วน 1:1:1 เพาะเมล็ด 2 แบบ คือแบบแกะเมล็ดออกจากฝักแล้วนำเมล็ดไปเพาะหรือนำฝักทั้งฝักไปเพาะเมล็ดโดยไม่แกะเมล็ดออกจากฝักก่อน บันทึกระยะเวลาที่ใช้ในการงอกของเมล็ดและเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด ตลอดจนการเจริญเติบโตของต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ด ในลักษณะของจำนวนใบต่อต้น และความสูงของต้นอ่อน

3 สถานที่ทำการวิจัย

3.1 แปลงทดลองของศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่อันเนื่องมาจากพระราชดำริ

3.2 ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

4 ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

กุมภาพันธ์ 2541 ถึง มีนาคม 2542

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University