บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 พืชทดลอง

พืชที่ใช้ในการทดลอง คือ ว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นบ้าน 3 พันธุ์ คือ พันธุ์ดอกสีแดง (ภาพที่ 2) พันธุ์ดอกสีส้ม (ภาพที่ 3) และพันธุ์ดอกสีชมพู (ภาพที่ 4) จากศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

ภาพที่ 2 ดอกของว่านสี่ทิศพื้นบ้านพันธุ์ดอกสีแดง (R)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ภาพที่ 3 ดอกของว่านสี่ทิศพื้นบ้านพันธุ์ดอกสีส้ม (O)

ภาพที่ 4 ดอกของว่านสี่ทิศพื้นบ้านพันธุ์ดอกสีชมพู (P)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

1.2 วัสดุ อุปกรณ์ และ เครื่องมือเพื่อใช้ในการปลูกพืชทดลองเพื่อศึกษาการผสมเกสรและการศึกษาโครโมโซม

1.2.1 วัสดุปลูก ประกอบด้วย ดินร่วน แกลบดิบ และถ่านแกลบ ในอัตราส่วน 2:1:1 และวัสดุปลูกเพื่อเก็บตัวอย่างปลายราก คือ ทรายหยาบ

1.2.2 วัสดุเพาะเมล็ด ประกอบด้วย ทรายหยาบ และถ่านแกลบ ในอัตราส่วน 1:1

1.2.3 ถุงพลาสติกสีดำขนาด 4×6 นิ้ว

1.2.4 ตะกร้าพลาสติกสำหรับเพาะเมล็ด

1.2.5 ยากันรา (ชื่อการค้า: Benlate OD; ชื่อสามัญ: Benomyl)

1.2.6 ซองกระดาษลอกลายสำหรับคลุมเกสรตัวเมีย

1.2.7 ซองกระดาษลอกลายสำหรับบรรจุละอองเกสร

1.2.8 วัสดุอื่นๆ ได้แก่ แผ่นป้ายพลาสติก มีด ลวด และ ดินสอ

1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาโดยวิธีการ paraffin embedding

1.3.1 หลอดแก้ว (vial) สำหรับเก็บตัวอย่างพืชทดลอง

1.3.2 ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ระดับ 56 °ซ

1.3.3 กระดาษปอนด์พับเป็นกระทง (boat) สำหรับฝังเนื้อเยื่อ

1.3.4 แท่งไม้ขนาด 1.5×1.5×1.5 ซม^3 ที่ผ่านการต้มให้อิ่มตัวด้วยพาราฟิน

1.3.5 เครื่องตัดชิ้นส่วนพืชแบบล้อหมุน (rotary microtome)

1.3.6 กล้องจุลทรรศน์สองตาแบบสเตอริโอ (stereo microscope)

1.3.7 กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ (photomicroscope)

1.3.8 สไลด์และกระจกปิดสไลด์

1.3.9 แผ่นให้ความร้อน (hot plate)

1.3.10 ขวดแก้วพร้อมฝาปิดสำหรับย้อมสี (staining jar)

1.3.12 อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ พู่กัน มีดผ่าตัดพร้อมใบมีด เข็มเขี่ยปลายงอ และตะเกียงแอลกอฮอล์

1.4 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเนื้อเยื่อพืชและสไลด์ถาวร

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

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

1.4.2 น้ำยาสำหรับดึงน้ำออกจากเซล (dehydrating solution) โดยมีส่วนผสมและอัตราส่วนของสารเคมีตามวิธีของ Sass (1966) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ส่วนผสมและอัตราส่วนของสารเคมีในการเตรียมน้ำยาสำหรับดึงน้ำออกจากเซล

สารเคมี	ระดับแอลกอฮอล์ (%)				
	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	-	-

1.4.3 พาราฟินเหลว

1.4.4 สารตัวกลางที่ใช้สำหรับฝังเนื้อเยื่อเพื่อการตัด (embedding media) ได้แก่ Paraplast

1.4.5 น้ำยาสำหรับยึดเนื้อเยื่อให้ติดแน่นบนแผ่นสไลด์ (adhesive) ได้แก่ albumin ซึ่งมีส่วนผสมและอัตราส่วนในการเตรียม stock solution ดังนี้

ไข่ขาว 1 มล

น้ำกลั่น 49 มล

นำ stock solution 1 มล มาเติมน้ำกลั่นให้ครบ 50 มล แล้วจึงนำไปใช้

1.4.6 น้ำยาสำหรับทำให้เนื้อเยื่อสะอาด (clearing reagent) ได้แก่ xylol

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	มล
95% ethyl alcohol	25	มล
methyl alcohol	100	มล
glycerol	100	มล

1.4.8 สารตัวกลางสำหรับปิดสไลด์ คือ Canada balsam (Merck)

1.5 เครื่องมือ วัสดุ และ อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาทางเซลวิทยา

1.5.1 ปลายรากพืชทดลอง ดังข้อ 1.1

1.5.2 ปลายรากว่านสี่ทิศลูกผสมที่ได้จากการทดลอง 6 คู่ผสม

1.5.3 ขวดแก้วขนาดเล็กสำหรับเก็บตัวอย่างราก

1.5.4 water bath

1.5.5 ปรอทวัดความร้อน

1.5.6 กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope

1.5.7 กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพชนิด photomicroscope

1.5.8 สไลด์และกระจกปิดสไลด์

1.5.9 วัสดุอื่นๆ ได้แก่ ปากคีบ มีดผ่าตัด เข็มเขี่ย กระบอกตวงสารเคมี และ น้ำยาทาเล็บ

1.6 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาทางเซลวิทยา

1.6.1 para-dichlorobenzene (PDB)

1.6.2 95% ethyl alcohol และ glacial acetic acid ในอัตราส่วน 3:1

1.6.3 กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 1 นอร์มอล

1.6.4 สีย้อมโครโมโซม คือ carbol fuchsin

2. วิธีการ

การศึกษาแบ่งออกเป็น 3 การทดลอง คือ

2.1 การทดลองที่ 1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย

การศึกษาในส่วนนี้เป็นการติดตามการเจริญเติบโตของดอกของพืชทดลอง คือ ว่านสี่ทิศ พันธุ์พื้นบ้าน 3 พันธุ์ คือ พันธุ์พื้นบ้านดอกสีแดง พันธุ์พื้นบ้านดอกสีส้ม และพันธุ์พื้นบ้านดอกสีชมพู เพื่อหาข้อมูลเกี่ยวกับการสร้างและการเจริญเติบโตของเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย ตลอดจนความสมบูรณ์ของอับละอองเกสรและรังไข่ และช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผสมเกสรของพืชทดลองทั้ง 3 พันธุ์

เก็บตัวอย่างดอกย่อยที่มีการเจริญเติบโตในระยะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน 7 ระยะ จากช่อดอกทั้งที่ยังอยู่ภายในหัวที่กำลังพักตัวอยู่ และจากช่อดอกที่แทงขึ้นมาเหนือพื้นดินแล้ว ได้ดอกที่มีความยาว 8 ขนาด คือ 0.1-0.4, 0.5-0.6, 0.7-0.8, 0.9-1.1, 1.2-1.4, 1.5-1.9, 2.0-3.0 และ 4.0 ซม ถึงระยะดอกบาน นำดอกที่เก็บมานั้นไปศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาตามวิธี paraffin embedding ของ Johansen (1940)

การศึกษาเนื้อเยื่อของดอกมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

2.1.1 เก็บตัวอย่างดอกอ่อน นำไปแช่ในน้ำยา FAA เพื่อหยุดการทำงานของเซลและรักษาสภาพเซล

2.1.2. ดึงน้ำออกจากเซลของเนื้อเยื่อ ด้วยน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลทั้ง 5 ระดับ จากนั้นนำเนื้อเยื่อลงแช่ใน TBA นาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปแช่ในน้ำยาที่มีส่วนผสมของ TBA และ พาราฟินเหลวในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.1.3 นำเนื้อเยื่อไปแช่ใน Paraplast ที่หลอมไว้ ในขวดแก้วขนาดเล็ก แล้วนำไปเก็บในตู้ที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 56 ° ซ เพื่อให้ Paraplast ซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อ เมื่อพร้อมจึงนำเนื้อเยื่อไปฝังใน Paraplast เพื่อตัดเนื้อเยื่อต่อไป

2.1.4 ตัดชิ้นส่วนพืชซึ่งฝังใน Paraplast แล้ว ด้วยเครื่องตัดชิ้นส่วนพืชชนิดล้อหมุนให้ชิ้นส่วนของพืชที่ตัดมีความหนา 13-15 ไมครอน โดยตัดตามยาวและ/หรือตามขวางตามความเหมาะสม

2.1.5 นำชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชที่ได้จากการตัดมาคัดเลือกเอาเฉพาะบริเวณที่ต้องการภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสองตา แล้วนำแถบเนื้อเยื่อไปติดบนแผ่นสไลด์ โดยใช้ albumin เป็นตัวยึดให้ติดกับสไลด์ อุ่นแผ่นสไลด์ให้แห้งสนิทบนแผ่นให้ความร้อน

2.1.6 นำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชที่ติดบนแผ่นสไลด์ไปผ่านขั้นตอนของการละลาย Paraplast ออกจากเนื้อเยื่อโดยใช้ xylol แล้วย้อมด้วยสี Delafield's hematoxylin ปิดด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์โดยใช้ Canada balsam เป็นตัวยึดแผ่นสไลด์ถาวร

2.1.7 นำเนื้อเยื่อไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพเนื้อเยื่อของส่วนประกอบของดอกใต้กล้องจุลทรรศน์ตามความเหมาะสม

2.1.8 ติดตามระยะพร้อมผสมของดอกของพืชทดลอง จากช่อดอกที่แทงขึ้นมาในช่วงก่อนระยะบานดอกจนกระทั่งถึงช่วงที่ดอกบานเต็มที่

2.2 การทดลองที่ 2 การผสมเกสรและการติดตามการเจริญเติบโตของต้นลูกผสม

การทดลองนี้เป็นการศึกษาความเป็นไปได้ในการผสมเกสรว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นบ้านที่เป็นพันธุ์แตกต่างกัน 3 พันธุ์ ดังระบุในข้อ 1.1 โดยใช้วิธีการผสมแบบสลับพ่อแม่ และการผสมตัวเอง หลังจากนั้นติดตามผลของการผสมติด ตลอดจนการเจริญเติบโตของฝักของดอกที่ผสมติด ทดสอบการงอกของเมล็ด เมื่อต้นกล้าเจริญเติบโตและแข็งแรง จึงย้ายกล้าออกปลูกลงแปลง เพื่อติดตามการเจริญเติบโตของต้นลูกผสม

วิธีการศึกษามีดังนี้

2.2.1 การเตรียมต้นพืชทดลอง

นำหัวพันธุ์ของพืชทดลองทั้ง 3 พันธุ์ แช่ในน้ำยากันรานเล้วนำไปผึ่งให้แห้งในที่ร่ม หลังจากนั้นนำหัวไปเก็บไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 13 ° ซ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ต่อมานำหัวออกมาปลูกในถุงพลาสติกสีดำที่บรรจุวัสดุปลูก เลี้ยงไว้ภายในโรงเรือนกันฝนจนถึงระยะที่ต้นให้ดอก

2.2.2 การเตรียมดอกของต้นแม่พันธุ์

เลือกต้นแม่พันธุ์ที่มีก้านช่อดอกแข็งแรงและมีดอกตูมที่สมบูรณ์ คัดดอกตูมที่พร้อมจะบานในวันรุ่งขึ้นเพื่อทำหมันดอก การทำหมันดอกทำโดยใช้มีดตัดกลีบดอกและเกสรตัวผู้ออกให้เหลือเฉพาะส่วนของเกสรตัวเมีย สำหรับกรณีที่เป็นการผสมแบบผสมตัวเองนั้น ดอกของต้นนั้นไม่ตัดอับละอองเกสรออก เมื่อทำหมันดอกเสร็จแล้วนำซองกระดาษคลุมดอกเอาไว้เพื่อป้องกันการผสมข้ามจากละอองเกสรที่ไม่ต้องการ

2.2.3 การเตรียมละอองเกสรจากต้นพ่อพันธุ์

เลือกดอกที่จะใช้เป็นดอกตัวผู้ โดยเลือกดอกตูมซึ่งพร้อมที่จะบานในวันรุ่งขึ้น ตัดอับละอองเกสรของดอกที่เลือกแล้วบรรจุลงในซองกระดาษ นำไปไว้ในห้องที่แห้งและอากาศถ่ายเทสะดวก เพื่อให้อับละอองเกสรแตกออก เมื่ออับละอองเกสรแตกออกแล้วเคาะซองกระดาษเพื่อให้ละอองเกสรหลุดออกจากอับละอองเกสรมารวมกันตรงมุมซองกระดาษ จากนั้นคีบอับละอองเกสรทิ้งไป

2.2.4 การผสมเกสร

เมื่อเกสรตัวเมียของดอกที่ใช้เป็นต้นแม่อยู่ในระยะพร้อมผสม นำละอองเกสรของดอกที่เตรียมไว้มาผสมแบบสลับพ่อแม่ด้วยมือ โดยเปิดซองกระดาษที่คลุมดอกตัวเมียออก โน้มยอดเกสรตัวเมียลงไปในซองบรรจุละอองเกสรเพื่อให้ยอดของเกสรตัวเมียสัมผัสกับละอองเกสรที่บรรจุอยู่ในซอง จากนั้นใช้ซองกระดาษคลุมดอกตัวเมียไว้เหมือนเดิม ติดป้ายบอกชื่อคู่ผสมและวันที่ผสมไว้ที่ก้านดอกที่ผสมแล้ว ผสมเกสรจำนวน 150 ดอกในแต่ละคู่ผสม ช่วงเวลาของการผสมเกสรคือ 7.30-9.00 น คู่ผสมมีดังนี้

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

2.2.5 การเพาะเมล็ดลูกผสม

นำเมล็ดที่ได้จากคู่ผสมต่างๆ ไปเพาะในตะกร้าที่บรรจุวัสดุเพาะเพาะเมล็ดเป็นแถว หยอดเมล็ดลงในหลุมๆ ละ 1 เมล็ด รดน้ำให้ชุ่ม ตั้งตะกร้าเพาะไว้ภายในโรงเรือนที่พรางแสงและกันฝนได้ บันทึกข้อมูลดังต่อไปนี้

2.2.5.1 จำนวนดอกที่ได้รับการผสม และดอกที่ผสมติดและได้ฝักแก่

2.2.5.2 ระยะเวลาในการติดฝักจนถึงระยะฝักแก่

2.2.5.3 จำนวนเมล็ดต่อฝัก

2.2.5.4 การงอกของเมล็ด

2.2.6 การเจริญเติบโตของต้นลูกผสม

โดยติดตามการอยู่รอดของต้นอ่อน การเจริญเติบโตทางใบ และ การออกดอกของลูกผสมแต่ละคู่ ตลอดจนติดตามลักษณะทางสัณฐานของต้นลูกผสมที่สามารถอยู่รอดและเจริญเติบโตได้

2.3 การทดลองที่ 3 การศึกษาเซลวิทยา

การทดลองนี้เป็นการศึกษาโครโมโซมของว่านสี่ทิศ 3 พันธุ์ซึ่งเป็นพ่อแม่พันธุ์ และศึกษาโครโมโซมของลูกผสมที่ได้จากการผสมพันธุ์ 6 คู่ผสม โดยใช้เทคนิคการศึกษาโครโมโซมจากเนื้อเยื่อปลายรากของต้นพืชเป้าหมาย ด้วยวิธี Feulgen squash method บรรยายโดย อมรา (2540), อดิศร (2539) และ Dyer (1979)

วิธีการมีดังต่อไปนี้

2.3.1 เตรียมรากพืช โดยนำหัวของต้นที่จะศึกษามาตัดรากเก่าที่ติดมากับหัวออกให้หมด ผึ่งหัวให้แห้งแล้วนำไปชำในกระบะทราย รดน้ำให้ชื้นตลอดเวลา รอจนกว่าหัวงอกรากใหม่ออกมา

2.3.2 เก็บตัวอย่างรากในช่วงเวลา 9.45-10.00 น ของแต่ละวัน เลือกเก็บรากที่กำลังเจริญเติบโตซึ่งเป็นรากที่มีสีขาวและปลายรากมีสีขาวขุ่นเล็กน้อย ล้างรากให้สะอาด ตัดรากให้มีความยาวจากปลายรากขึ้นมาประมาณ 1 ซม

2.3.3 นำปลายรากลงแช่ในสารละลาย PDB เก็บไว้ในที่ที่มีอุณหภูมิประมาณ 15 ° ซ และไม่เกิน 18 ° ซ เป็นเวลา 35-36 ชั่วโมง

2.3.4 หยุดวงชีพของเซล โดยการนำรากจากข้อ 2.3.3 มาล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปแช่ในน้ำยาหยุดวงชีพเซลนานอย่างน้อย 5 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งหนึ่ง

2.3.5 นำรากไปแช่ในกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 1 นอร์มอล ที่อุณหภูมิ 60 ° ซ เพื่อแยกเซลออกจากกันจนกระทั่งรากนิ่ม แล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น

2.3.6 ย้อมเนื้อเยื่อรากด้วยสี carbol fuchsin ทิ้งเนื้อเยื่อไว้ในสีเป็นเวลาอย่างน้อย 12 ชั่วโมง

2.3.7 นำเนื้อเยื่อที่ย้อมสีแล้ววางบนแผ่นสไลด์ ใช้มีดผ่าตัดตัดเฉพาะส่วนปลายรากให้ยาวประมาณ 1 มม เขี่ยส่วนเกินทิ้งไป หยดสี carbol fuchsin หยดเล็กๆ ลงบนเนื้อเยื่อปลายรากนั้น จากนั้นใช้ด้ามเข็มเขี่ย เคาะเนื้อเยื่อเบาๆ เพื่อให้เซลหลุดออกจากกัน ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ซับสีส่วนที่เกินออกด้วยกระดาษซับ

2.3.8 นำแผ่นสไลด์ไปศึกษาโครโมโซมและนับจำนวน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเลือกเซลที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมตาเฟส และเป็นเซลที่มีการกระจายตัวของโครโมโซมดี สามารถที่จะนับจำนวนโครโมโซมได้แม่นยำ เมื่อได้เซลที่ต้องการแล้วกดกระจกปิดสไลด์เบาๆ เพื่อให้เซลแบนอยู่ในระนาบเดียวกัน ซับขอบกระจกปิดสไลด์ให้แห้ง ใช้น้ำยาทาเล็บทาบริเวณขอบของกระจกปิดสไลด์หลายๆ ชั้นเพื่อป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อแห้ง นำแผ่นสไลด์ไปศึกษาและบันทึกภาพโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3. สถานที่วิจัย

3.1 แปลงทดลองของศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ

3.2 ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

4. ระยะเวลาในการวิจัย

เดือน พฤษภาคม 2542 ถึงเดือน กันยายน 2544

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University