บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาทดลองแบ่งออกเป็น 5 การทดลองย่อย คือ การทดลองที่ 1 การสำรวจและรวบรวมพันธุ์ การทดลองที่ 2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหงส์เหินที่เก็บรวบรวมมาจำนวน 10 ตัวอย่างจาก 30 ตัวอย่างที่แตกต่างกัน การทดลองที่ 3 การศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยาของพืชทดลอง การทดลองที่ 4 การศึกษาโครโมโซมจากเนื้อเยื่อปลายรากของพืชทดลอง และ การทดลองที่ 5 การศึกษาการเกิดและการเจริญของดอก

อุปกรณ์และวิธีการทดลองมีดังต่อไปนี้

การทดลองที่ 1 การสำรวจและรวบรวมพันธุ์

สำรวจและรวบรวมหงส์เหินที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติในป่าเขตพื้นที่ป่าขุนแม่กวง บริเวณอำเภอดอยสะเก็ด และ กิ่งอำเภอแม่ออน จังหวัดเชียงใหม่ บันทึกสภาพทางนิเวศวิทยาของแหล่งเจริญเติบโตและลักษณะทางสัณฐานของพืชแต่ละตัวอย่างที่แตกต่างกัน แล้วนำไปปลูกในแปลงรวบรวมพันธุ์ภายในศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่

1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.1.1 อุปกรณ์ในการสำรวจและเก็บตัวอย่างคือ เสียม ถุงพลาสติกสีดำขนาด 20 x 30 นิ้ว เชือก ป้ายชื่อ ไม้บรรทัด และ ตลับเมตร กล้องถ่ายภาพพร้อมฟิล์ม สมุดบันทึก ดินสอและยางลบ

1.1.2 วัสดุปลูก ได้แก่ ดิน ขี้เถ้าแกลบ และเปลือกถั่ว อัตราส่วน 2:2:1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2 การบันทึกข้อมูล

สำรวจและรวบรวมต้นหงส์เหินในพื้นที่เป้าหมาย บันทึกข้อมูลดังต่อไปนี้

1.2.1 บันทึกสภาพนิเวศวิทยาของพื้นที่ที่พบว่ามีต้นพืชทดลอง เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ

1.2.2 บันทึกลักษณะเด่นของพืชทดลองแต่ละตัวอย่าง ถ่ายภาพ ขุดต้นพืชใส่ถุงดำและติดป้ายชื่อตามสถานที่ที่สำรวจพบ

1.2.3 รวบรวมพืชทดลองจากพื้นที่สำรวจแต่ละแหล่ง แล้วนำลงปลูกในแปลงรวบรวมพันธุ์

การทดลองที่ 2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชทดลองจำนวน 10 ตัวอย่างจาก 30 ตัวอย่างที่แตกต่างกัน

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1 พืชทดลอง

คัดเลือกพืชทดลองจากหงส์เหินที่เก็บรวบรวมมาโดยคัดเลือกตัวอย่างที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันอย่างเด่นชัดและเรียกชื่อตัวอย่างตามรหัสประจำตัวอย่างที่แตกต่างกันดังนี้ HK/GH5 HK/GP2 HK/HK1 HK/HK2 HK/HK3 HK/HK4 HK/ML1 HK/MW2 และ HK/TMN1 นำพืชทดลองดังกล่าวมาปลูกเลี้ยงไว้ในแปลงทดลองตัวอย่างละ 10 ต้น

2.1.2 อุปกรณ์บันทึก ได้แก่ สมุด ปากกา ไม้บรรทัด มีดผ่าตัด ปากคีบ ดินสอดำและกระดาษสำหรับวาดภาพส่วนประกอบของต้นพืช

2.2 วิธีการ

2.2.1 บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของส่วนประกอบของต้นพืชทดลอง ได้แก่ ราก ต้น ใบ ดอก และผล ในระยะที่ต้นและดอกเจริญเติบโตเต็มที่ โดยบันทึกลักษณะจากตัวอย่างกรรมวิธีละ 5 ต้น พร้อมทั้งวาดภาพ

2.2.2 บันทึกจำนวนและขนาดของส่วนประกอบของต้นดังนี้

2.2.2.1 ต้น โดยบันทึกจำนวนต้นต่อกอ และความสูงของต้นที่สูงที่สุดในกอ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.2.2 ใบ โดยบันทึกจำนวนใบต่อต้นของต้นที่สูงที่สุดในกอ และขนาดของใบที่ 4 นับจากโคนต้น

2.2.2.3 ช่อดอก โดยบันทึกขนาดของช่อดอก จำนวนดอกต่อช่อ จำนวนใบประดับต่อช่อ ขนาดของใบประดับที่ใหญ่ที่สุดในช่อ และตำแหน่งของใบประดับ

2.2.2.4 ดอก บันทึกขนาดของดอก

2.2.2.5 ผล บันทึกขนาดของผล

2.2.2.6 หัวย่อย บันทึกจำนวนหัวย่อยต่อช่อ ขนาดของหัวย่อยและตำแหน่งของหัวย่อย

การทดลองที่ 3 การศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยา

การทดลองนี้เป็นการศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยาของพืชทดลองที่ระบุไว้ในการทดลองที่ 2 โดยศึกษาจากเนื้อเยื่อที่ตัดตามยาวและตามขวางของลำต้น ราก ใบ ดอก และ รังไข่ ตามวิธีการศึกษาเนื้อเยื่อแบบ paraffin embedding ของ Johansen (1940)

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 พืชทดลอง

พืชทดลองคือหงส์เหินจำนวน 10 ตัวอย่างที่แตกต่างกันดังระบุในข้อ 2.1.1

3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการศึกษาเนื้อเยื่อ

3.1.2.1 เครื่องตัดชิ้นส่วนพืชแบบล้อหมุน (rotary microtome)

3.1.2.2 กล้องจุลทรรศน์แบบ dissecting microscope และ stereo microscope พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

3.1.2.3 ตู้อบที่ปรับอุณหภูมิเป็น 56 ซ

3.1.2.4 แผ่นให้ความร้อน (hot plate)

3.1.2.5 เครื่องอุ่นสไลด์ที่ปรับอุณหภูมิเป็น 40 ซ

3.1.2.6 แท่งไม้สี่เหลี่ยมขนาด 1.5 x 1.5 x 1.5 ลบ. ซม ที่ต้มให้อิ่มตัวในพาราฟิน

3.1.2.7 แผ่นสไลด์ (slide) และแผ่นปิดสไลด์ (cover slip)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.2.8 อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดสำหรับใส่ชิ้นส่วนพืช บีก-เกอร์ และขวดย้อมสี

3.1.2.9 อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ ตะเกียงแอลกอฮอล์ พู่กันขนอ่อน ปากคีบ และป้ายติดกาว

3.1.3 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมชิ้นส่วนพืชและสไลด์ถาวร

3.1.3.1 น้ำยารักษาสภาพเซลล์ (fixative) ได้แก่ FAA (Formalin – Acetic acid – Alcohol) ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมดังนี้

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

3.1.3.2 น้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution) ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 2 ส่วนผสมของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์

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

3.1.3.3 สารตัวกลางที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อ (embedding media) ได้แก่ Paraplast

3.1.3.4 น้ำยายึดเนื้อเยื่อพืชให้ติดแผ่นสไลด์ (adhesive)

เตรียมน้ำยาเข้มข้นจากส่วนผสมของ

ไข่ขาว	1	มล
น้ำกลั่น	49	มล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อจะใช้นำน้ำยาเข้มข้นมาเจือจาง โดยใช้น้ำยาเข้มข้น 1 มล มาเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรรวมเป็น 50 มล

3.1.3.5 สีย้อมเนื้อเยื่อใช้สี Dalafield's hematoxylin เตรียมสีโดยใช้ส่วนผสมดังนี้

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

3.1.3.6 น้ำยาทำให้เนื้อเยื่อสะอาด (clearing reagent) คือ xylene

3.1.3.7 สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นสไลด์ (mounting media) คือ Canada balsam

3.2 วิธีการ

3.2.1 เก็บตัวอย่างของลำต้น ราก ใบ ดอก และ รังไข่ ของพืชทดลองแช่ในน้ำยา FAA ที่บรรจุในขวดแก้ว แล้วนำขวดแก้วเหล่านั้นใส่ในเครื่องดูดอากาศเพื่อไล่ฟองอากาศออกจากเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นปิดฝาขวดแล้วนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนานอย่างน้อย 24 ชั่วโมงก่อนนำไปผ่านขั้นตอนต่อไป

3.2.2 นำเนื้อเยื่อมาผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยให้เนื้อเยื่อผ่านน้ำยาดึงน้ำออกจากเซลล์ จากระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในน้ำยา 50% ไปจนถึงระดับ 100% แล้วจึงนำเนื้อเยื่อไปผ่าน TBA 100% ตามด้วยน้ำยาที่ประกอบด้วย TBA และพาราฟินเหลวอัตราส่วน 1:1 นานขั้นตอนละ 24 ชั่วโมง แล้วนำเนื้อเยื่อไปผ่านขั้นตอนของการแทรกพาราฟินเข้าไปในเนื้อเยื่อ (infiltration)

3.2.3 ถ่ายเนื้อเยื่อลงไปในขวดแก้วที่บรรจุ Paraplast ที่หลอมแล้ว นำขวดแก้วไปเก็บไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 56 ซ นานประมาณ 1 สัปดาห์ หรือมากกว่าเพื่อให้พาราฟินแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อได้เต็มที่

3.2.4 นำเนื้อเยื่อพืชมาฝังในพาราฟิน แล้วจัดตำแหน่งของเนื้อเยื่อให้อยู่ในตำแหน่งและระนาบที่ต้องการ

3.2.5 นำแท่งพาราฟินที่ได้ไปตัดแต่งให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ให้ชิ้นส่วนพืชอยู่ตรงกลางแล้วนำมาติดกับแท่งไม้ จากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุนโดยตัดเนื้อเยื่อตามยาวหรือตามขวางให้หนา 15- 18 ไมครอน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.6 นำแถบชิ้นส่วนพืช (paraffin ribbon) ติดลงบนแผ่นสไลด์ด้วยน้ำยายึดเนื้อเยื่อพืช วางแผ่นสไลด์บนเครื่องอุ่นสไลด์ จนแถบชิ้นส่วนแห้งและติดกับแผ่นสไลด์

3.2.7 นำแผ่นสไลด์ที่ละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อแล้วนำไปย้อมสี ปิดแผ่นสไลด์ด้วยแผ่นปิดสไลด์โดยใช้ Canada balsam ยึด

3.2.8 เมื่อแผ่นสไลด์แห้งสนิท นำแผ่นสไลด์ไปศึกษาเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพ

การทดลองที่ 4 การศึกษาเซลล์วิทยา

การทดลองนี้เป็นการศึกษาโครโมโซมจากเนื้อเยื่อปลายรากของพืชทดลองที่ระบุไว้ในการทดลองที่ 2 ตามวิธีการของ Chen (1992)

4.1 วัสดุและอุปกรณ์

4.1.1 ปลายรากพืชทดลอง

4.1.2 ขวดแก้วขนาดความจุ 15 มล สำหรับเก็บตัวอย่างปลายราก

4.1.3 แผ่นสไลด์และแผ่นปิดสไลด์

4.1.4 เข็มเขี่ย

4.1.5 ปากคีบ

4.1.6 มีดผ่าตัด

4.1.7 กล้องจุลทรรศน์แบบ dissecting microscope และ stereo microscope พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

4.1.8 ตะเกียงแอลกอฮอล์

4.1.9 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาโครโมโซม

4.1.9.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับหยุดวงชีพของเซลล์ (pretreatment solution) ได้แก่ para – dichlorobenzene (PDB)

4.1.9.2 สารเคมีที่ใช้เตรียมน้ำยาในการรักษาสภาพเซลล์ (fixative solution) คือ 95% ethyl alcohol และ glacial acetic acid ในอัตราส่วน 3 :1 โดยปริมาตร

4.1.9.3 สารเคมีที่ใช้ย่อยแยกเซลล์ออกจากกันคือ 1 N HCl

4.1.9.4 สีที่ใช้ย้อมโครโมโซมคือ carbol fuchsin

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2 วิธีการ

4.2.1 เตรียมปลายรากโดยเลือกปลายรากของรากที่กำลังเจริญเติบโต และมีความยาว 1 ซม ตัดมาเฉพาะส่วนปลายให้มีความยาว 1-2 มม เก็บตัวอย่างปลายรากในช่วงเวลา 7.00 – 10.00 น.

4.2.2 หยุดวงชีพเซลล์โดยการแช่ปลายรากในสารละลาย PDB เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมงที่อุณหภูมิประมาณ 10° ซ

4.2.3 นำปลายรากออกมาจากสารละลาย PDB ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ นาน 5 นาทีจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น

4.2.4 แยกเซลล์โดยการแช่รากใน 1 N HCl นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 60° ซ แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น

4.2.5 ย้อมเนื้อเยื่อปลายรากใน carbol fuchsin แช่ไว้นาน 1 คืน หลังจากนั้นคีบเนื้อเยื่อวางบนแผ่นสไลด์ หยดสีย้อม 1 หยดตรงบริเวณปลายราก ใช้เข็มเขี่ยเคาะเนื้อเยื่อให้แยกออกเป็นชิ้นเล็กๆ คีบเนื้อเยื่อส่วนเกินทิ้ง ปิดกระจกปิดสไลด์บนบริเวณที่มีเนื้อเยื่อ ใช้กระดาษซับวางบนแผ่นสไลด์เพื่อซับสีที่มากเกินไปออก กดนิ้วหัวแม่มือลงไปเพื่อให้เซลล์กระจาย

4.2.6 นำแผ่นสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมตาเฟสและมีโครโมโซมกระจายไม่ทับกัน นับจำนวนโครโมโซม แล้วบันทึกภาพ

การทดลองที่ 5 การศึกษาการเกิดและการเจริญของดอก

ศึกษาการเกิดและการเจริญของดอกของพืชทดลองที่ระบุไว้ในการทดลองที่ 2 โดยนำดอกของพืชทดลองที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตแตกต่างกันมาศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา ดังเสนอวิธีการไว้ในข้อ 3

ในการเก็บตัวอย่างดอกของพืชทดลองนั้นเก็บดอกที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตแตกต่างกัน ตั้งแต่ดอกที่มีขนาดเล็กมากจนถึงดอกบาน แล้วรักษาสภาพของดอกในน้ำยา FAA หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อของตาดอกหรือส่วนประกอบของดอกไปผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อทำสไลด์ถาวร แล้วนำเนื้อเยื่อภาคตัดตามยาวและตัดตามขวางไปศึกษา พร้อมทั้งบันทึกภาพใต้กล้องจุลทรรศน์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สถานที่ทำการวิจัย

แปลงทดลองของศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

เริ่มวิจัยในเดือน พฤษภาคม 2545 และสิ้นสุดการวิจัยในเดือน กรกฎาคม 2547

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved