บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 วงจรการเจริญเติบโต

การทดลองนี้เป็นการศึกษาการเจริญเติบโตของต้นว่านมหาโชคและบัวดินสีขาวโดยติดตามการเจริญเติบโตของพืชทดลองตลอดระยะเวลา 1 ปี

1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.1.1 พืชทดลอง

พืชทดลอง คือ ว่านมหาโชคและบัวดินสีขาว หัวที่ใช้ปลูกเพื่อการทดลองเป็นหัวที่มีเส้นรอบวง 14.0 – 15.9 ซม ในว่านมหาโชค และ หัวที่มีเส้นรอบวง 4.0 – 5.9 ซม ในบัวดินสีขาว

1.1.2 วัสดุปลูก คือ ดิน ขี้เถ้าแกลบ และ เปลือกถั่ว ในอัตราส่วน 2:1:1

1.1.3 ถุงพลาสติกสีดำ ขนาด 4 X 6 นิ้ว

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

1.1.5 สายยางรดน้ำพร้อมฝักบัว

1.1.6 วัสดุอื่นๆ ได้แก่ ถุงมือยาง แผ่นป้ายพลาสติก ลวด ดินสอ และ เวอร์เนียคาลิเปอร์

1.2 วิธีการวิจัย

ปลูกหัวพันธุ์พืชทดลองในถุงพลาสติกที่บรรจุเครื่องปลูก ว่านมหาโชคปลูกในเดือนกุมภาพันธ์ และ บัวดินสีขาวปลูกในเดือนตุลาคม เลี้ยงไว้ใต้โรงเรือนกรองแสงที่มีแสงประมาณ 70 %

1.3 การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลดังนี้

1.31 ความยาวใบ โดยว่านมหาโชควัดจากใบที่ 2 ของต้น ส่วนบัวดินสีขาววัดจากใบที่ยาวที่สุดของต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3.2 ช่วงเวลาออกดอก

1.3.3 จำนวนช่อดอกต่อต้น

1.3.4 ลักษณะการสร้างหัว

1.3.5 ตำแหน่งของหัวย่อย

1.3.6 จำนวนหัวใหม่ต่อต้น

1.3.7 ช่วงเวลาพักตัว

การทดลองที่ 2 การเจริญเติบโตของดอก

การทดลองนี้เป็นการศึกษาการเจริญเติบโตของดอกว่านมหาโชคและบัวดินสีขาว แบ่งออกเป็น 3 การทดลองย่อย ดังนี้

2.1 ผลของขนาดหัวที่มีต่อการออกดอก

2.1.1 พืชทดลอง

พืชทดลอง คือ ว่านมหาโชคที่ปลูกจากหัวที่มีขนาดต่างกัน 6 ขนาด คือ เส้นรอบวง 10.0-11.9, 12.0-13.9, 14.0-15.9, 16.0-17.9, 18.0-19.9, และ 20.0-21.9 ซม และบัวดินสีขาวที่ปลูกจากหัวที่มีขนาดต่างกัน 3 ขนาด คือ ขนาดเส้นรอบวง 2.0 – 3.9, 4.0 – 5.9 และ 6.0 –7.9 ซม

2.1.2 วัสดุและอุปกรณ์

วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้เหมือนกับในข้อ 1.1.2 - 1.1.6

2.1.3 วิธีการวิจัย

ปลูกหัวพันธุ์ของพืชทดลองทุกขนาด ในถุงพลาสติกสีดำที่บรรจุเครื่องปลูก ขนาดละ 5 ต้น เลี้ยงไว้ใต้โรงเรือนกรองแสงเช่นเดียวกับในข้อ 1.2 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยมี 6 กรรมวิธี บัวดินสีขาวมี 3 กรรมวิธี ในแต่ละกรรมมีวิธี 5 ซ้ำ

2.1.4 การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูล ดังนี้

2.1.4.1 ช่วงเวลาออกดอก

2.1.4.2 จำนวนช่อดอกหรือดอก/ต้น/ปี

2.1.4.3 คุณภาพของช่อดอกหรือดอกได้แก่ ความยาวก้านช่อดอก จำนวนดอกต่อช่อ เส้นผ่าศูนย์กลางดอก ความกว้างและความยาวของกลีบดอก

2.1.4.4 ความยาวนานของการบานของดอกบนต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 การเริ่มกำเนิดช่อดอกหรือดอกและการเจริญของช่อดอกหรือดอก

การทดลองนี้เป็นการศึกษาการเริ่มกำเนิดช่อดอกหรือดอกของพืชทดลองที่ปลูกจากหัวขนาดต่าง ๆ ดังระบุในข้อ 2.1.1 โดยศึกษากายวิภาควิทยาของดอกจากเนื้อเยื่อของตาดอกที่อยู่ภายในหัวในช่วงเวลาต่าง ๆ ของการเจริญเติบโตของต้น เตรียมเนื้อเยื่อเพื่อการศึกษาด้วยวิธีการ paraffin embedding (Johansen, 1940) โดยเก็บตัวอย่างตายอดและตาข้างในช่วงเวลาต่าง ๆ ของการเจริญเติบโตของต้นมาศึกษา

2.2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.2.1.1. อุปกรณ์

2.2.1.1.1 ขวดพลาสติกขนาดเล็กและหลอดแก้วสำหรับเก็บตัวอย่างพืช

2.2.1.1.2 ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ระดับอุณหภูมิ 56° ซ

2.2.1.1.3 เครื่องตัดชิ้นส่วนพืชแบบล้อหมุน (rotary microtome)

2.2.1.1.4 แผ่นให้ความร้อนสำหรับอุ่นแผ่นกระจก (slide)

2.2.1.1.5 กล้องจุลทรรศน์สองตาแบบสเตอริโอ (stereo microscope)

2.2.1.1.6 กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ (photo microscope)

2.2.1.1.7 แท่งไม้ขนาด 1.5 X 1.5 X 1.5 ซม^3 ที่ผ่านการต้มให้อิ่มตัวในพาราฟิน

2.2.1.1.8 แผ่นกระจกพร้อมแผ่นปิดกระจก (cover slip)

2.2.1.1.9 ขวดแก้วสำหรับย้อมสี

2.2.1.1.10 อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ ตะเกียงแอลกอฮอล์ มีดผ่าตัด ปากคีบ และเข็มเขี่ย

2.2.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเนื้อเยื่อและแผ่นกระจกถาวร

2.2.1.2.1 น้ำยาสำหรับฆ่าและรักษาสภาพเซลล์ (killing and fixing solution) คือ FAA (formalin – acetic acid - alcohol) ซึ่งประกอบด้วยสารเคมีในอัตราส่วนดังต่อไปนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

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

2.2.1.2.2 น้ำยาสำหรับดึงน้ำออกจากเซลล์(dehydrating solution) ซึ่งมีส่วนผสมของ 95 % ethyl alcohol, absolute alcohol, tertiary butyl alcohol (TBA) ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 5 ระดับ ตามวิธีของ Sass (1966) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 2 ส่วนผสมและความเข้มข้นของน้ำยาที่ใช้สำหรับดึงน้ำออกจากเซลล์

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

2.2.1.2.3 พาราฟินเหลว

2.2.1.2.4 สารตัวกลางที่ใช้สำหรับฝังเนื้อเยื่อเพื่อการตัด (embedding media) ได้แก่ Paraplast

2.2.1.2.5 น้ำยาสำหรับยึดเนื้อเยื่อให้ติดบนแผ่นกระจก (adhesive) ได้แก่ albumin ซึ่ง stock solution ของน้ำยามีส่วนผสมดังนี้

ไข่ขาว	1	มล
น้ำกลั่น	49	มล

นำ stock solution มา 1 มล เติมน้ำกลั่นให้ครบ 50 มล แล้วจึงนำไปใช้

2.2.1.2.6 น้ำยาสำหรับทำให้เนื้อเยื่อสะอาด (clearing reagent) ได้แก่ xylol

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.1.2.7 สีสังเคราะห์สำหรับย้อมเนื้อเยื่อคือ Dalafield's hematoxylin เตรียมโดยใช้ส่วนประกอบดังต่อไปนี้

aluminium sulfate $[Al_2 (SO_4)_3. 16H_2 O]$	400	มล
hematoxylin $[C_6H_{14}O_6]$	4	กรัม
95 % ethyl alcohol	25	มล
methyl alcohol	100	มล
glycerol	100	มล

2.2.1.2.8 สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นกระจก คือ Canada balsam (Merck)

2.2.2 วิธีการวิจัย

2.2.2.1 เตรียมเนื้อเยื่อตัวอย่างพืชโดยการนำหัวของต้นพืชทดลองที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ มาแกะกาบหัวออกให้หมดแล้วตัดเอาตาที่อยู่บริเวณกลางหัวและตาข้างไปแช่ในน้ำยา FAA เป็นเวลานานอย่างน้อย 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำไปผ่านกรรมวิธีการดึงน้ำออกจากเซลล์

2.2.2.2 ดึงน้ำออกจากเซลล์ของเนื้อเยื่อด้วยน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์โดยผ่านเนื้อเยื่อลงไปในน้ำยาทั้ง 5 ระดับจากระดับที่มีความเข้มข้นของแอลกอฮอลล์ต่ำที่สุดไปจนถึงสูงที่สุด ระดับละประมาณ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเนื้อเยื่อลงแช่ใน 100 % TBA นาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปแช่ในน้ำยาที่มีส่วนผสมของ TBA และพาราฟินเหลวในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2.2.3 นำเนื้อเยื่อไปแช่ใน Paraplast ที่หลอมไว้ในขวดแก้วขนาดเล็ก แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้ที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 56 °ซ เพื่อให้ Paraplast ซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อเมื่อพร้อมที่จะตัดเนื้อเยื่อจึงนำไปฝังใน Paraplast ที่หลอมรอไว้ ต่อจากนั้นจึงนำไปตัดเนื้อเยื่อ

2.2.2.4 ตัดชิ้นส่วนของพืชให้ชิ้นส่วนมีความหนา 13–15 ไมครอน โดยใช้เครื่องตัดชิ้นส่วนพืชแบบล้อหมุน

2.2.2.5 นำชิ้นส่วนของพืชที่ตัดได้มาติดบนแผ่นกระจก โดยใช้น้ำยายึดเนื้อเยื่อให้ติดกับแผ่นกระจก

2.2.2.6 นำเนื้อเยื่อที่ติดบนแผ่นกระจกไปละลาย Paraplast ออกโดยแช่ใน xylol หลังจากทำความสะอาดแผ่นกระจกแล้วนำเนื้อเยื่อไปย้อมด้วยสี Dalafield's hematoxylin ปิดแผ่นกระจกโดยใช้ Canada balsam เป็นตัวยึดแผ่นปิดกระจกถาวร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.2.7 นำเนื้อเยื่อไปศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์และบันทึกภาพเนื้อเยื่อของอวัยวะต่าง ๆ ของดอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ตามความเหมาะสม

2.3 การเจริญของเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมีย

2.3.1 การสร้างและการเจริญของเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมีย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาการเจริญเติบโตของดอกของพืชทดลอง เพื่อติดตามการสร้างและการเจริญของเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมียตลอดจนการเจริญของรังไข่ โดยศึกษาจากเนื้อเยื่อของดอกที่มีการเจริญเติบโตในระยะต่างกัน

การศึกษาทำโดยนำดอกย่อยที่มีระยะการเจริญเติบโตต่างกัน ตั้งแต่ดอกขนาดเล็กที่สุดไปจนถึงดอกที่มีขนาดใหญ่ที่สุดไปผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อเป็นแผ่นกระจกถาวรเพื่อการศึกษากายวิภาคของดอกตามขั้นตอนและวิธีการที่บรรยายไว้ในข้อ 2.2.2 แล้วศึกษาเนื้อเยื่อใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อบันทึกการสร้างและการเจริญของเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมีย

2.3.2 ความสมบูรณ์และความมีชีวิตของละอองเรณู

การศึกษานี้เป็นการนำดอกที่อยู่ในระยะของการปล่อยละอองเรณูมาศึกษาความสมบูรณ์และความมีชีวิตของละอองเรณู

2.3.2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.3.2.1.1 ละอองเรณูของพืชทดลอง

2.3.2.1.2 กล้องจุลทรรศน์สองตาชนิด compoumd microscope

2.3.2.1.3 ขวดบรรจุละอองเรณู

2.3.2.1.4 silica gel

2.3.2.1.5 วัสดุอื่น ๆ ได้แก่ จานแก้ว กระดาษกรอง แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม แผ่นกระจก หลอดหยด ปากคีบ และ เข็มเขี่ย

2.3.2.1.6 อาหารเหลวสำหรับเลี้ยงละอองเรณูตามวิธีการของ Brewbaker and Beyong (1963) ซึ่งประกอบด้วย

stock mimeral solution

H_3BO_3	0.10	กรัม
$Ca(NO_3).4\ H_2O$	0.30	กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

$MgSO_4 . 7 H_2O$	0.20	กรัม
KNO_3	0.10	กรัม
น้ำ	100	มล

culture solution

stock mimeral solution	1.0	มล
sucrose	0.2 – 1.0	กรัม
น้ำ	9.0	มล

2.3.2.2 วิธีการศึกษา

2.3.2.2.1 สุ่มเก็บตัวอย่างละอองเรณูจากอับเรณูของดอกที่มีอายุต่างกัน โดยเก็บจากอับเรณูของดอกที่บานแล้ว 1 วัน ซึ่งเป็นระยะที่อับเรณูยังไม่แตก จากดอกที่บานแล้ว 2 วัน ซึ่งเป็นระยะที่อับเรณูเริ่มแตก และจากดอกที่บานแล้ว 3 วัน ซึ่งเป็นระยะที่อับเรณูแตกเต็มที่

2.3.2.2.2 หยดอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงละอองเรณูบนแผ่นกระจกแผ่นละ 2 หยดแล้วนำละอองเรณูที่สุ่มมาใส่ลงบนหยดอาหารนั้น

2.3.2.2.3 นำแผ่นกระจกไปวางไว้ในจานแก้วที่รองพื้นด้วยกระดาษกรองชุ่มน้ำเพื่อให้ความชื้นแก่ละอองเรณูในอาหาร โดยมีแท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมรองรับแผ่นกระจกไว้ ปิดฝาจานแก้วและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ติดตามการงอกของละอองเรณูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และบันทึกผลการงอกของละอองเรณู

การทดลองที่ 3 การศึกษาโครโมโซม

การศึกษานี้เป็นการศึกษาโครโมโซมร่างกายของว่านมหาโชคและบัวดินสีขาว จากเนื้อเยื่อปลายราก ด้วยวิธี Feulgen's squash method ซึ่งดัดแปลงโดย ดวงทิพย์ (2539) และศิริพร (2541)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 ปลายรากของว่านมหาโชคและบัวดินสีขาว

3.1.2 ขวดแก้วขนาดเล็กสำหรับเก็บตัวอย่างราก

3.1.3 แผ่นกระจกพร้อมแผ่นปิดกระจก

3.1.4 เข็มเขี่ยและปากคีบ

3.1.5 อ่างต้มน้ำที่ปรับอุณหภูมิได้

3.1.6 กล้องจุลทรรศน์ พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

3.1.7 ปรอทวัดความร้อน

3.1.8 สารเคมี

3.1.8.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับการหยุดวงชีพเซลล์ (pretreatment) ได้แก่ PDB

3.1.8.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมน้ำยารักษาสภาพเซลล์(fixative) คือ 95 % ethyl acohol และ glacial acetic acid ในอัตราส่วน 3 : 1

3.1.8.3 สารเคมีที่ใช้แยกเซลล์ (hydrolytic solution) คือ กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 1 นอร์มอล (1 N HCl)

3.1.8.4 สีที่ใช้ย้อมโครโมโซม คือ carbol fuchsin

3.2 วิธีการวิจัย

3.2.1 เตรียมรากพืชทดลองโดยนำหัวมาตัดรากเก่าทิ้งแล้วนำไปชำในกระบะที่บรรจุวัสดุเพาะ หลังจากนั้น 5 –7 วัน รากจะงอกออกมาจากฐานของหัว

3.2.2 เก็บตัวอย่างรากทุก ๆ 1 ชั่วโมง โดยเริ่มจาก 7.30 ถึง 16.30 น. เลือกรากที่สมบูรณ์ ตัดปลายรากมาเพียง 3 – 5 มม

3.2.3 หยุดวงชีพของเซลล์โดยนำปลายรากที่ได้มาแช่ในสารละลาย PDB ที่อิ่มตัวในน้ำ เก็บไว้ในที่ที่มีอุณหภูมิประมาณ15°ซ และไม่เกิน 18 °ซ เป็นเวลา 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

3.2.4 รักษาสภาพเซลล์โดยนำรากที่ผ่านการแช่ในสารละลาย PDB แล้วมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น 2 –3 ครั้ง จากนั้นนำไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์นาน 5 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น

3.2.5 ย่อยแยกเซลล์โดยการแช่รากลงใน 1 N HCl ที่อุณหภูมิ 60°ซ เป็นเวลานาน 5–10 นาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น

3.2.6 ย้อมสีเนื้อเยื่อใน carbol fuchsin เป็นเวลานาน 6,12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

3.2.7 นำปลายรากที่ผ่านการย้อมสีแล้ววางบนแผ่นกระจก ขยี้แล้วหยดสี carbol fuchsin 1 หยด ตรงบริเวณที่มีเนื้อเยื่อ ใช้เข็มเขี่ยเคาะเนื้อเยื่อเบา ๆ ให้เซลล์กระจาย ใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ปากคีบคีบเนื้อเยื่อที่ไม่ต้องการออก แล้วปิดแผ่นปิดกระจกบนบริเวณที่มีเนื้อเยื่อ วางกระดาษซับบนแผ่นกระจกแล้วกดแผ่นปิดกระจกเพื่อให้เซลล์กระจาย ซับสีที่มากเกินไปออก

3.2.8 นำแผ่นกระจกไปศึกษาโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยเลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมตาเฟสและโครโมโซมกระจายดี สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้แม่นยำ เมื่อได้เซลล์ที่ต้องการแล้วกดเบา ๆ เพื่อให้เซลล์แบนและอยู่ในระนาบเดียวกัน ใช้น้ำยาทาเล็บทาบริเวณขอบแผ่นปิดกระจกเพื่อป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อแห้ง นำแผ่นกระจกไปตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อนับจำนวนโครโมโซมและบันทึกภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved