บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. อุปกรณ์

1.1 พืชทดลอง

กล้วยไม้ช้างกระที่ใช้ในการทดลองมีอายุ 3 ปี ที่เคยผ่านการออกดอกมาแล้ว โดยมีขนาดต้นสูง 15 เซนติเมตร มี 4-5 คู่ใบ เป็นต้นที่ได้จากการผสมพันธุ์และเพาะเลี้ยงจากต้นพ่อแม่เดียวกันทั้งหมด คัดต้นที่มีขนาดที่ใกล้เคียงกันมากที่สุดและมีความสมบูรณ์ทั้งต้น ใบ และระบบราก พร้อมที่จะออกดอกได้ (ภาพที่ 3) และเป็นต้นที่ยังไม่มีการพัฒนาของตาดอก

ภาพที่ 3 กล้วยไม้ช้างกระอายุ 3 ปี

1.2 อุปกรณ์

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้แบ่งตามการศึกษาหลักๆ ดังต่อไปนี้

<u>การศึกษาการเจริญเติบโตทางลำต้น การออกดอก และคุณภาพของช่อดอก</u>

1. ชุดควบคุมที่ทำให้เกิดสภาพมืดเพื่อให้ความยาววันสั้นลงกว่าสภาพความยาววันปกติ ทำโดยใช้ราวแขวนกล้วยไม้ที่คลุมด้วยผ้าสีดำที่แสงไม่สามารถลอดผ่านได้ และราวแขวนที่ได้รับสภาพความยาววันปกติ ทั้ง 2 ชุดทำด้วยโครงเหล็ก มีขนาดกว้าง 1.20 เมตร ยาว 8.0 เมตร สูง 2.0 เมตร สามารถแขวนกล้วยไม้ช้างกระได้ชุดละ 180 ต้น ใช้แรงงานคนในการปิด-เปิดผ้าดำที่ใช้คลุม (ภาพที่ 4)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 4 ชุดควบคุมที่ทำให้เกิดสภาพวันสั้น (สภาพมืด) และสภาพวันปกติ

2. เครื่องบันทึกอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ และความเข้มแสง (data logger) ยี่ห้อ Testo รุ่น 175-H1 (ภาพที่ 5)

ภาพที่ 5 เครื่องบันทึกอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ และความเข้มแสง

3. ตลับเมตรหรือสายวัด
4. ไม้บรรทัด
5. เวอร์เนียคาลิปเปอร์
6. ไมโครปิเปต
7. ป้ายพลาสติกบอกรายละเอียด
8. เครื่องวัดความเข้มแสง (lux meter)
9. กล้องถ่ายรูประบบ digital

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การศึกษาทางกายวิภาควิทยาของตาดอกในช่วงของการออกดอก

1. เครื่องตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชแบบล้อหมุน (rotary-microtome)

2. กล้องจุลทรรศน์แบบ dissecting microscope และ stereo-microscope พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

3. กล้องจุลทรรศน์แบบ digital stereo-microscope พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพระบบ digital

4. ตู้อบที่สามารถปรับอุณหภูมิเป็น 60 ± 2 องศาเซลเซียส

5. แผ่นให้ความร้อน (hot plate)

6. เครื่องอุ่นแผ่นสไลด์ที่สามารถปรับอุณหภูมิเป็น 40 องศาเซลเซียส

7. กระทงกระดาษรูปสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 2.0 × 2.5 × 2.0 เซนติเมตร เพื่อใช้ในการฝังตัวอย่างพืชในพาราฟิน

8. แท่นไม้สำหรับตัดแต่งก้อนพาราฟินที่ฝังตัวอย่างพืชแล้ว

9. มีดคัตเตอร์ หรือ มีดผ่าตัด ที่ใช้สำหรับตัดแต่งก้อนพาราฟินที่ฝังตัวอย่างพืชแล้ว

10. แผ่นกระจกสไลด์ (slide) และแผ่นกระจกปิดสไลด์ (cover slip)

11. ขวดแก้ว (vial) สำหรับใส่ชิ้นส่วนตัวอย่างพืชในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ น้ำยาดึงน้ำออกจากเซลล์ และพาราฟินเหลว

12. บีกเกอร์ใส่พาราฟินที่สามารถนำมาหลอมละลายในตู้อบ 60 ± 2 องศาเซลเซียส

13. โหลแก้วดูดอากาศ ใช้สำหรับดูดไล่อากาศออกจากเซลล์ตัวอย่างพืชเพื่อให้น้ำยาเข้าไปแทนที่อากาศภายในเซลล์พืช

14. สีย้อมเนื้อเยื่อบนสไลด์ (Delafield's hematoxylin)

15. แท่งไม้รูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 1.5 × 1.5 × 1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่ต้มหรือแช่ให้อิ่มตัวในพาราฟิน เพื่อใช้สำหรับยึดชิ้นตัวอย่างพืชในพาราฟินที่แข็งตัว และนำมาตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ

16. น้ำยาสำหรับยึดแผ่นพาราฟิน (paraffin ribbon) ติดแผ่นสไลด์

17. น้ำยาคานาดาบัลซัม (canada balsam) สำหรับทำสไลด์ถาวร (permanent slide)

18. กล่องสำหรับผึ่งแผ่นสไลด์ และ กล่องสำหรับใส่สไลด์ถาวร

19. น้ำยาสำหรับเช็ดใบมีด คือ xylene

20. อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ ตะเกียงแอลกอฮอล์ ไฟแช็ก ปากคีบเหล็ก เข็มเขี่ย พู่กันขนอ่อน แผ่นป้ายบอกรายละเอียด มีดคัตเตอร์ มีดผ่าตัด ใบมีดโกนที่คม และเทปกาว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

<u>การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลและแป้งในช่วงของการออกดอก</u>

1. เขียงไม้หรือเขียงพลาสติก
2. มีดสำหรับหั่นตัวอย่างพืช
3. โกร่งบดพร้อมแท่งบด
4. ขวดน้ำกลั่น
5. หลอดทดลอง
6. หลอดสำหรับเครื่องหมุนเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตร
7. ขวดรูปชมพู่
8. ขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร
9. ปิเปตแก้วขนาด 1 2 5 และ 10 มิลลิลิตร
10. กระบอกตวงขนาด 10 และ 25 มิลลิลิตร
11. ขวดพลาสติกสำหรับใส่สารละลาย
12. อุปกรณ์เครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลองทางการทำปฏิกิริยาเคมี เช่น หลอดหยดพร้อมจุกยาง บีกเกอร์ กรวยกรอง แท่งแก้วคนสาร และขวดสีชา เป็นต้น
13. อุปกรณ์อื่นๆ เช่น ตะแกรงวางหลอดทดลอง กระดาษกรอง ช้อนตักสาร ถุงพลาสติก ยางรัด กระดาษบอกรายละเอียด ปากกาเคมี ดินสอ กระดาษฟอยล์ และนาฬิกาจับเวลา เป็นต้น
14. ตู้อบแห้ง
15. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
16. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
17. อ่างน้ำร้อน (waterbath)
18. เครื่องปั่น (vortex)
19. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) 10,000 รอบต่อนาที
20. ตู้สำหรับทำปฏิกิริยาเคมี (ตู้ดูดควันและสารระเหย)

1.3 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้แบ่งตามการศึกษาหลักๆ ดังต่อไปนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การศึกษาการเจริญเติบโตทางลำต้น การออกดอก และคุณภาพของช่อดอก

1. สารละลายกรดจิบเบอเรลลิก (GA_3)
2. เอทธานอล
3. น้ำกลั่น

การศึกษาทางกายวิภาควิทยาของตาดอกในช่วงของการออกดอก

1. น้ำยารักษาสภาพเซลล์ (fixative) คือ ฟอร์มาลีนอะซิติกแอลกอฮอล์ (FAA) ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมดังต่อไปนี้

เอทิลแอลกอฮอล์ 95 %	50	มิลลิลิตร
อะซิติกแอซิด	5	มิลลิลิตร
ฟอร์มาลีน	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	35	มิลลิลิตร

2. น้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution) ประกอบด้วยส่วนผสมดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนผสมของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ในแต่ละขั้นตอน

ขั้นตอน	ปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ (%)	เอทิลแอลกอฮอล์ 95 % (มิลลิลิตร)	เอทิลแอลกอฮอล์ 100 % (มิลลิลิตร)	เทอเชียรีบิวทิวแอลกอฮอล์ (TBA) (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
1	50	40	-	10	50
2	70	50	-	20	30
3	85	50	-	35	15
4	95	45	-	55	-
5	100	-	25	75	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. สารตัวกลางที่ใช้ฝังตัวอย่างเนื้อเยื่อพืช (embedding media) ได้แก่ paraplast

4. น้ำยาสำหรับยึดเนื้อเยื่อพืชให้ติดแผ่นสไลด์ (adhesive) โดยการเตรียมน้ำยาเข้มข้นจากส่วนผสมของไข่ขาว 1 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 49 มิลลิลิตร เมื่อต้องการนำมาใช้ ให้นำน้ำยาเข้มข้นมาเจือจางลงโดยใช้น้ำยาเข้มข้น 1 มิลลิลิตร มาเติมน้ำกลั่นและปรับปริมาตรรวมให้ได้ 50 มิลลิลิตร

5. สีย้อมเนื้อเยื่อ ใช้ Delafield's hematoxylin ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมดังนี้

อะลูมิเนียมซัลเฟต [$Al_2 (SO_4)_3.16H_2O$]	400 มิลลิลิตร
ฮีมาทอกซ์ไซลีน ($C_{16}H_{14}O_6$)	4 กรัม
เอทิลแอลกอฮอล์ 95 %	25 มิลลิลิตร
เมทิลแอลกอฮอล์	100 มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	100 มิลลิลิตร

6. น้ำยาสำหรับทำให้เนื้อเยื่อสะอาด (clearing reagent) คือ ไซลีน

7. สารตัวกลางหรือน้ำยาสำหรับปิดแผ่นสไลด์ (mounting media) คือ แคนาดาบัลซัม (canada balsam)

<u>การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลและแป้งในช่วงของการออกดอก</u>

1. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์น้ำตาล ได้แก่

1.1 เอทานอล 100 %

1.2 เอทานอล 80 %

1.3 น้ำตาล D-Glucose, anhydrous

1.4 ฟีนอล 5 % (น้ำหนัก/ปริมาตร)

1.5 กรดซัลฟูริกเข้มข้น

1.6 น้ำกลั่น

2. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์แป้ง ได้แก่

2.1 น้ำตาล D-Glucose, anhydrous

2.2 กรดซัลฟูริกเข้มข้น

2.3 กรดเปอร์คลอริก ($HClO_4$) 8.14 N

2.4 แอนโทรน (anthrone)

2.5 น้ำกลั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. วิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ 2 × 3 แฟคทอเรียลในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) มี 2 ปัจจัย คือ

1. สภาพความยาววัน ได้แก่ สภาพความยาววันปกติ และสภาพวันสั้น (สภาพมืด)
2. กรดจิบเบอเรลลิก (GA_3) ได้แก่ 0 1,000 และ 3,000 สตล. (ส่วนต่อล้าน)

ในแต่ละการทดลอง ประกอบด้วย 6 กรรมวิธีๆ ละ 3 ซ้ำๆ ละ 5 ต้น ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ให้ได้รับสภาพความยาววันปกติ ร่วมกับการให้ GA_3 0 สตล.

กรรมวิธีที่ 2 ให้ได้รับสภาพความยาววันปกติ ร่วมกับการให้ GA_3 1,000 สตล.

กรรมวิธีที่ 3 ให้ได้รับสภาพความยาววันปกติ ร่วมกับการให้ GA_3 3,000 สตล.

กรรมวิธีที่ 4 ให้ได้รับสภาพวันสั้น 14 ชั่วโมงต่อวันติดต่อกัน ร่วมกับการให้ GA_3 0 สตล.

กรรมวิธีที่ 5 ให้ได้รับสภาพวันสั้น 14 ชั่วโมงต่อวันติดต่อกัน ร่วมกับการให้ GA_3 1,000 สตล.

กรรมวิธีที่ 6 ให้ได้รับสภาพวันสั้น 14 ชั่วโมงต่อวันติดต่อกัน ร่วมกับการให้ GA_3 3,000 สตล.

แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ช่วงระยะเวลาได้แก่

<u>การทดลองที่ 1</u> ทำการทดลองในช่วงเดือนพฤษภาคม 2549 ถึงเดือนมกราคม 2550

กล้วยไม้ช้างกระจำนวน 90 ต้น แบ่งออกเป็น 2 ชุดๆ ละ 45 ต้น ชุดที่ 1 ปลูกเลี้ยงให้ได้รับแสงสว่างจำนวน 10 ชั่วโมง (สภาพวันสั้น) โดยการคลุมผ้าดำในเวลา 18.00 น. และเปิดผ้าดำออกในเวลา 8.00 น. (รวม 14 ชั่วโมง) เป็นระยะเวลา 3 เดือน เริ่มตั้งแต่เดือนพฤษภาคม (ซึ่งเป็นสภาพวันยาว) ถึงเดือนกรกฎาคม ชุดที่ 2 ปลูกเลี้ยงในสภาพวันปกติ คือสภาพวันยาว และในแต่ละเดือนให้ GA_3 จำนวน 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 10 วัน รวมทั้งหมด 9 ครั้ง โดยความเข้มข้นของ GA_3 ที่ทำการทดลอง 3 ระดับ ได้แก่ 0 1,000 และ 3,000 สตล.

<u>การทดลองที่ 2</u> ทำการทดลองในช่วงเดือนมิถุนายน 2549 ถึงเดือนมกราคม 2550

ทำการทดลองทำนองเดียวกันกับการทดลองที่ 1 แตกต่างกันที่เริ่มต้นการทดลองในเดือนมิถุนายนและสิ้นสุดในเดือนสิงหาคม

<u>การทดลองที่ 3</u> ทำการทดลองในช่วงเดือนกรกฎาคม 2549 ถึงเดือนมกราคม 2550

ทำการทดลองทำนองเดียวกันกับการทดลองที่ 1 และการทดลองที่ 2 แตกต่างกันที่เริ่มต้นการทดลองในเดือนกรกฎาคมและสิ้นสุดในเดือนกันยายน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. วิธีการศึกษาและการบันทึกผล

<u>การศึกษาการเจริญเติบโตทางลำต้น การออกดอก และคุณภาพของช่อดอก</u>

1. การเจริญเติบโตทางลำต้น
    1.1 ความสูงลำต้น (วัดจากโคนต้นถึงปลายยอดบริเวณโคนใบคู่บนสุด)
    1.2 ความกว้างทรงพุ่มหรือทรงต้น
    1.3 เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น
    1.4 จำนวนใบต่อต้น
    1.5 ความกว้างใบ
    1.6 ความยาวใบ
    1.7 ความหนาใบ
2. ระยะเวลาการพัฒนาของตาดอกและการบานดอก
    2.1 จำนวนวันที่สังเกตเห็นตาดอก (นับจากเริ่มทดลอง)
    2.2 จำนวนวันที่ดอกแรกบาน (นับจากเริ่มทดลอง)
    2.3 จำนวนวันที่สังเกตเห็นตาดอกถึงดอกบาน
3. คุณภาพของช่อดอกและดอก
    3.1 คุณภาพช่อดอก
        3.1.1 เปอร์เซ็นต์การออกดอก
        3.1.2 จำนวนช่อดอกต่อต้น
        3.1.3 ความยาวช่อดอก
        3.1.4 ความยาวก้านช่อดอก
        3.1.5 ความยาวช่อดอกรวม
    3.2 คุณภาพดอก
        3.2.1 จำนวนดอกต่อช่อ
        3.2.2 ความกว้างดอก
        3.2.3 ความยาวดอก
        3.2.4 ความยาวก้านดอก
    3.3 ระยะเวลาการบานดอกและอายุการบานดอก
        3.3.1 จำนวนวันที่ดอกบาน 10 เปอร์เซ็นต์ของช่อดอก (นับจากดอกแรกเริ่มบาน)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.2 จำนวนวันที่ดอกบาน 50 เปอร์เซ็นต์ของช่อดอก (นับจากดอกแรกเริ่มบาน)

3.3.3 จำนวนวันที่ดอกบาน 100 เปอร์เซ็นต์ของช่อดอก (นับจากดอกแรกเริ่มบาน)

3.3.4 อายุการบานดอก (นับจากดอกแรกบานถึงดอกเหี่ยว 50 เปอร์เซ็นต์ของช่อดอก)

4. ภาพถ่ายการพัฒนาของช่อดอกและการบานดอก

<u>การศึกษาทางกายวิภาควิทยาของตาดอกในช่วงของการออกดอก</u>

1. สุ่มเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเจริญที่เป็นจุดเจริญของตาดอกในแต่ละกรรมวิธีของแต่ละการทดลอง ทั้งก่อนและหลังจากการให้ได้รับกรรมวิธีต่างๆ ทุก 4 สัปดาห์ โดยสุ่มเก็บตัวอย่างกรรมวิธีละ 3 ซ้ำๆ ละ 1 ต้น ในแต่ละซ้ำเก็บเนื้อเยื่อตาดอก 2-3 ชิ้น จนถึงระยะแทงช่อดอก มาตรวจดูการพัฒนาของตาดอกด้วยกล้อง digital stereo microscope กำลังขยาย 2,500 เท่า และบันทึกภาพ

2. นำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อตาดอกมาศึกษาโดยวิธีการทางเนื้อเยื่อวิทยาแบบวิธี Paraffin embedding และการทำสไลด์ถาวรตามวิธีการของ Johansen (1940) และ Sass (1966) เพื่อดูการพัฒนาของตาดอก

วิธีการเตรียมสไลด์ถาวรของตัวอย่างชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

2.1 เก็บตัวอย่างของตาดอกกล้วยไม้ช้างกระก่อนเริ่มทำการทดลองเพื่อตรวจดูพัฒนาการการเจริญเติบโตของตาดอก และทำการเก็บตัวอย่างตาดอกเมื่อสังเกตเห็นต้นเริ่มแทงตาดอกมาแช่ในน้ำยา FAA ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้ว (vial) แล้วนำขวดดังกล่าวไปใส่ในโถแก้วที่ต่อกับเครื่องดูดอากาศเพื่อไล่อากาศออกจากเซลล์ของเนื้อเยื่อเป็นเวลาประมาณ 1–2 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำออกมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนานอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปผ่านน้ำยาต่างๆ ในขั้นตอนต่อไป

2.2 นำตัวอย่างเนื้อเยื่อตาดอกมาผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยผ่านการแช่น้ำยาในระดับต่างๆ โดยเริ่มจากน้ำยาที่มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ 50 % ไปจนถึง 100 % (ตารางที่ 1) ระดับละ 1 คืน จากนั้นนำตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ผ่านน้ำยาระดับต่างๆ แล้วมาแช่ใน TBA 100 % 1 คืน และตามด้วย TBA + พาราฟิน ในอัตราส่วน 1 : 1 เป็นเวลา 1 คืน เช่นเดียวกัน แล้วนำไปผ่านขั้นตอนของการแทนที่พาราฟินเข้าไปในเซลล์ของเนื้อเยื่อตัวอย่างพืช (infiltration) เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ขึ้นไป

2.3 นำตัวอย่างเนื้อเยื่อแช่ในพาราฟินที่ผ่านการหลอมละลายแล้วและนำไปไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 56–60 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้จนกระทั่งพาราฟินแทรกซึมเข้าแทนที่น้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และอากาศภายในเซลล์ทั้งหมดอย่างเต็มที่และสมบูรณ์ สำหรับตาดอกกล้วยไม้ช้างกระเป็นเนื้อเยื่อเจริญที่เจริญเติบโตออกมาจากด้านข้างของลำต้นซึ่งมีลักษณะของเนื้อเยื่อที่ค่อนข้างแข็งต้องแช่ในพาราฟินไว้นานประมาณ 1 เดือนขึ้นไป

2.4 นำตัวอย่างตาดอกที่อิ่มด้วยพาราฟินเต็มที่แล้วมาวางในกล่องกระดาษพับรูปสี่เหลี่ยมที่มีขนาดประมาณ 2.0 × 2.5 × 2.0 เซนติเมตร ที่บรรจุด้วยพาราฟินเหลว จากนั้นจัดตำแหน่งของตัวอย่างเนื้อเยื่อให้อยู่ตรงกลางกระทงกระดาษและวางให้อยู่ในระนาบที่ต้องการแล้วทิ้งไว้ให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง

2.5 แกะเอาก้อนพาราฟินที่มีตัวอย่างชิ้นส่วนเนื้อเยื่อฝังอยู่ออกจากกระทงกระดาษแล้วนำไปตัดแต่งด้วยมีดคัตเตอร์หรือมีดผ่าตัดให้มีลักษณะเป็นแท่งรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสหรือสี่เหลี่ยมผืนผ้า (แล้วแต่ขนาดและลักษณะการจัดวางชิ้นส่วนตัวอย่างพืชในพาราฟิน) จากนั้นนำไปติดกับแท่งไม้รูปสี่เหลี่ยมจตุรัส ขนาด 1.5 × 1.5 × 1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่ต้มหรือแช่ให้อิ่มตัวในพาราฟินแล้ว โดยใช้เศษพาราฟินที่เหลือจากการตัดแต่งหลอมยึดให้ติดกัน

2.6 นำแท่งไม้ที่เชื่อมติดกับก้อนพาราฟินที่ฝังตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชแล้วมาประกอบเข้ากับเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุน ทำการปรับองศาและแนวระนาบให้ได้พอดีกับการตัด จากนั้นทำการตัดเนื้อเยื่อตามยาวและตามขวางให้มีความหนา 13 ไมครอน เป็นแถบเส้น (ribbon) ต่อกันให้มีความยาวพอประมาณ แล้วเลือกตัดเอาแถบเนื้อเยื่อ (paraffin ribbon) ในช่วงที่ต้องการมาวางบนแผ่นสไลด์ และใช้น้ำยายึดแถบเนื้อเยื่อพืช (สารละลายไข่ขาว) ติดกับแผ่นสไลด์ จากนั้นนำไปอุ่นบนเครื่องให้ความร้อน (heater) จนกระทั่งแถบชิ้นส่วนพืชแห้งติดกับแผ่นสไลด์โดยไม่ให้มีฟองอากาศ

2.7 นำแผ่นสไลด์ที่มีแถบชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชไปผ่านกระบวนการการละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อพืชแล้วนำไปย้อมสีให้เนื้อเยื่อพืชเกิดการติดสี และผึ่งให้แห้ง

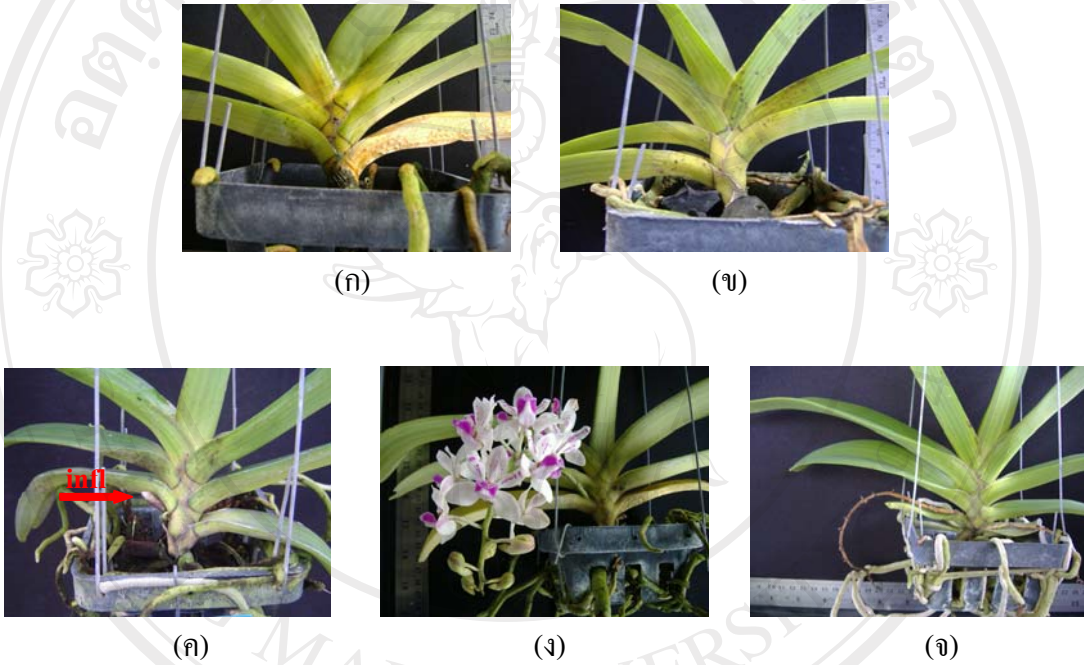
2.8 นำไปทำเป็นสไลด์ถาวร โดยการปิดแผ่นสไลด์ด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์ และใช้น้ำยาแคนาดาบาลซัม ยึดทั้ง 2 แผ่นไว้ (ในขั้นตอนนี้ต้องระวังฟองอากาศที่อาจเกิดขึ้นเมื่อทำการหยดน้ำยาแคนาดาบาลซัมลงบนเนื้อเยื่อพืช) ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

2.9 เมื่อน้ำยาที่สมานแผ่นสไลด์แห้งสนิท นำแผ่นสไลด์ถาวรที่ได้ไปศึกษาเนื้อเยื่อพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแป้งและน้ำตาลในช่วงออกดอก

นำตัวอย่างกล้วยไม้ช้างกระที่สุ่มได้ของแต่ละกรรมวิธีในแต่ละช่วงการทดลอง โดยทำการสุ่มตัวอย่างกรรมวิธีละ 3 ซ้ำๆ ละ 1 ต้น เก็บตัวอย่างใบและต้น ยกเว้นราก ในช่วงเวลาเดียวกันทั้งหมด คือ 8.00-9.00 น. มาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของแป้งและน้ำตาล โดยระยะเก็บตัวอย่างพืชมี 5 ระยะ ดังแสดงในภาพที่ 6



(ก) (ข)

(ค) (ง) (จ)

ภาพที่ 6 ระยะการเก็บตัวอย่างกล้วยไม้ช้างกระที่นำมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของแป้งและน้ำตาล

(ก) ระยะก่อนการทดลองที่ยังไม่มีการพัฒนาของตาดอก

(ข) ระยะหลังได้รับสภาพวันสั้นและ GA_3 4 สัปดาห์

(ค) ระยะแทงช่อดอก (ยาว 0.5-1.0 เซนติเมตร)

(ง) ระยะดอกบาน (50 % ของช่อดอก)

(จ) ระยะดอกเหี่ยว (หมดดอก)

หมายเหตุ : **infl** = ช่อดอก (inflorescence)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิเคราะห์หาความเข้มข้นของแป้งโดยวิธี Anthrone ของ JSPN (1990) (ภาคผนวก ก) บันทึกผลและนำค่าที่ได้มาแทนค่าคำนวณตามสูตรเพื่อหาความเข้มข้นของแป้ง (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)

วิเคราะห์หาความเข้มข้นของน้ำตาลโดยวิธี Phenol-sulphuric method (Dubois *et al*., 1956) (ภาคผนวก ข) บันทึกผลและนำค่าที่ได้มาแทนค่าคำนวณตามสูตรเพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาล (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด)

สถานที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. เรือนกล้วยไม้โครงการการพัฒนาไม้ดอกเศรษฐกิจ (กล้วยไม้) เพื่อเพิ่มศักยภาพในการส่งออก สถานีวิจัยและศูนย์ฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาการดำเนินการวิจัย

ระหว่างเดือนพฤษภาคม 2549 ถึงมกราคม 2551

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved