บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาทดลองแบ่งออกเป็น 5 การทดลองย่อย คือ การทดลองที่ 1 การรวบรวมเทียนพันธุ์ป่า การทดลองที่ 2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญเติบโต การทดลองที่ 3 การศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยา การทดลองที่ 4 การศึกษาด้านเซลล์วิทยา การทดลองที่ 5 ศึกษาการสร้างลูกผสม

การทดลองที่ 1 การรวบรวมเทียนพันธุ์ป่า

สำรวจและรวบรวมพันธุ์เทียนพันธุ์ป่าที่พบในสภาพธรรมชาติ ในเขตพื้นที่ดอยอินทนนท์และดอยเชียงดาว นำมาทดลองปลูกเลี้ยงในโรงเรือน ที่สถานีเกษตรหลวงอินทนนท์ อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่

1.1 วัสดุอุปกรณ์

1.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างพืชทดลองได้แก่ กระดาษ ถุงพลาสติก ปากกาดินสอ ป้ายพลาสติก อุปกรณ์บันทึกภาพ สมุดบันทึก

1.1.2 วัสดุปลูก ได้แก่ ดิน: ทราย : ขุยมะพร้าว: ถ่านแกลบ: แกลบ อัตรา 2 :1 :1 :1 :1

1.2 การบันทึกข้อมูล

1.2.1 บันทึกสภาพนิเวศน์ของพื้นที่ที่พบ

1.2.2 บันทึกลักษณะประจำพันธุ์ ถ่ายภาพ นำต้นพืชใส่ถุงพลาสติกพร้อมทั้งติดป้ายชื่อ

1.2.3 นำพันธุ์เทียนทั้งหมดที่รวบรวมได้ ปลูกในโรงเรือนรวบรวมพันธุ์

1.2.4 ส่วนขยายพันธุ์ที่เป็นเมล็ดนำไปเพาะในวัสดุที่ประกอบด้วยทราย:ขุยมะพร้าว ถ่านแกลบ อัตรา 1: 1 :1

การทดลองที่ 2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญเติบโต

2.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของเทียนจำนวน 8 หมายเลข ซึ่งมีความแตกต่างกันทั้งหมด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.1 วัสดุอุปกรณ์

2.1.1.1 พืชทดลอง

เมื่อได้ต้นเทียนทั้งหมดจำนวน 8 หมายเลขซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนและกำหนดชื่อตามแหล่งที่พบจากทั้ง 2 แหล่งให้เป็นหมายเลขดังนี้

2.1.1.1.1 IN-RD1 (Inthanon – Redar1)

2.1.1.1.2 IN-RD2 (Inthanon – Redar2)

2.1.1.1.3 IN-SP1 (Inthanon – Siriphum1)

2.1.1.1.4 IN-SP2 (Inthanon – Siriphum2)

2.1.1.1.5 IN-SP3 (Inthanon – Siriphum3)

2.1.1.1.6 CD-HL1 (Chiang Dao - Huayluek1)

2.1.1.1.7 CD-HL2 (Chiang Dao - Huayluek2)

2.1.1.1.8 CD-HL3 (Chiang Dao - Huayluek3)

(IN-RD1 – 2 พบที่บริเวณยอดดอยอินทนนท์ อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่)

(IN-SP1 – 3 พบที่บริเวณน้ำตกสิริภูมิ อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่)

(CD-HL1 – 3 พบที่บริเวณเชิงเขาหินปูน หมู่บ้านห้วยลึก ต.ปิงโค้ง อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่)

2.1.2 วิธีการ

2.1.2.1 บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของส่วนประกอบของต้นได้แก่ ลำต้น ใบ ดอก ผล และราก ในระยะที่ต้นและดอกเจริญเติบโตเต็มที่

2.2 ศึกษาการเจริญเติบโตและการพัฒนาดอก บันทึกการเจริญเติบโตทุกๆ 2 สัปดาห์

2.2.1 ความสูง

2.2.2 จำนวนใบต่อต้นโดย นับจาก คู่ใบที่ 5 จากโคนต้น

2.2.3 ลักษณะช่อดอก ขนาดช่อดอก จำนวนดอกต่อช่อ ลักษณะใบประดับ

2.2.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการบันทึกได้แก่ ตลับเมตร เวอร์เนียคาลิปเปอร์

2.2.5 วางแผนการทดลอง แบบ CRD / 3 ซ้ำ จำนวน 10 ต้นต่อซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 3 การศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยา

ศึกษาจากเนื้อเยื่อที่ตัดตามยาวและตามขวางของ ราก ลำต้น ใบ ดอก และผลของต้นพืชทดลองดังระบุในการทดลองที่ 2 โดยใช้ paraffin embedding ของ Johansen (1940)

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 พืชทดลอง ต้นเทียน จำนวน 8 หมายเลข ดังนี้IN-RD1 , IN-RD2 , IN-SP1 IN-SP2 , IN-SP3 , CD-HL1 , CD-HL2 และ CD-HL3

3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการศึกษาเนื้อเยื่อ

3.1.3 เครื่องตัดชิ้นส่วนพืชแบบล้อหมุน (rotary microtome)

3.1.4 กล้องจุลทรรศน์แบบ dissecting microscope และ stereo microscope พร้อมอุปกรณ์ ถ่ายภาพ

3.1.5 ตู้อบที่ปรับอุณหภูมิได้

3.1.6 แผ่นให้ความร้อน (hot plate)

3.1.7 เครื่องอุ่นสไลด์ที่ปรับอุณหภูมิได้

3.1.6 แท่งไม้สี่เหลี่ยมขนาด 1.5 x 1.5 x 1.5 ลบซม ที่ต้มให้อิ่มตัวใน พาราฟิน

3.1.7 แผ่นสไลด์ และแผ่นปิดสไลด์

3.1.8 อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดสำหรับใส่ชิ้นส่วนพืช บิ๊กเกอร์ และ ขวดย้อมสี

3.1.9 อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ ตะเกียงแอลกอฮอล์ พู่กันขนอ่อน ปากคีบ และป้ายติดกาว

3.1.10 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมชิ้นส่วนพืชและสไลด์ถาวร

3.1.11 สารละลายรักษาสภาพเซลล์ (Fixative) ได้แก่ Formalin-Acetic acid -Alcohol (FAA) ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมดังนี้

เอทธิลแอลกอฮอล์ 95 %	50	มล
glacial acetic acid	5	มล
Formalin	10	มล
น้ำกลั่น	35	มล

3.1.12 สารละลายที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution) ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมดังแสดงในตารางที่ 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 ส่วนผสมของในสารละลายที่ดึงน้ำออกจากเซลล์

ลำดับที่	เอทธิลแอลกอฮอล์ 95 % (มล)	เอทธิลแอลกอฮอล์ 100% (มล)	Tertiary butyl alcohol (มล)	น้ำกลั่น (มล)
1	40	-	10	50
2	50	-	20	30
3	50	-	35	15
4	45	-	55	-
5	-	25	75	-

3.1.13 สารตัวกลางที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อ (embedding media) ได้แก่ Paraplast

3.1.14 สารละลายยึดเนื้อเยื่อพืชให้ติดแผ่นสไลด์ (adhesive)

เตรียมจากส่วนผสมของ

ไข่ขาว 1 มล

น้ำกลั่น 49 มล

เมื่อจะใช้ ใช้สารละลายเข้มข้น 1 มล เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรรวมเป็น 50 ม

3.1.15 สีย้อมเนื้อเยื่อใช้สี Dalafied s hematoxylin เตรียมสีโดยใช้

aluminium sulfate [$Al_2 (SO_4)_3$, 16 H_2O]	400	มล
hematoxylin ($C_{16}H_{14}O_6$)	4	กรัม
glycerol	100	มล
95% เอทธิล แอลกอฮอร์	25	มล
เมทธิล แอลกอฮอร์	100	มล

3.1.16 สารละลายทำให้เนื้อเยื่อสะอาด (clearing reagent) ใช้ xylene

3.1.17 สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นสไลด์ (mounting media) คือ Canada balsam

3.2 วิธีการ

3.2.1 แช่ตัวอย่างในสารละลาย FAA ที่บรรจุในขวดแก้ว แล้วนำขวดแก้วเหล่านั้นใส่ในเครื่องดูดอากาศเพื่อไล่ฟองอากาศออกจากเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นปิดฝาขวดแล้วนำมาเก็บไว้ในอุณหภูมิห้องนานอย่างน้อย 24 ชั่วโมงก่อนนำไปผ่านขั้นตอนต่อไป

3.2.2 นำเนื้อเยื่อมาผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออกเซลล์ โดยให้เนื้อเยื่อแช่ในสารละลายดึงน้ำออกจากเซลล์ ลำดับที่ 1จนถึง 5(ในข้อ3.1.12) จึงนำเนื้อเยื่อไปแช่ TBA 100 % ตาม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ด้วยสารละลายที่ประกอบด้วย TBA และพาราฟินเหลว อัตราส่วน 1:1 นานขั้นตอนละ 24 ชั่วโมง แล้วนำเนื้อเยื่อไปแช่ขั้นตอนของการแทรกพาราฟินเข้าไปในเนื้อเยื่อ (infiltration)

3.2.3 ถ่ายเนื้อเยื่อลงไปในขวดบรรจุ Paraplast ที่หลอมแล้ว นำขวดแก้วไปเก็บไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 56 ° ซ นานประมาณ 1 สัปดาห์ เพื่อให้พาราฟินแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อได้เต็มที่

3.2.4 นำเนื้อเยื่อพืชมาฝังในพาราฟิน แล้วจัดตำแหน่งของเนื้อเยื่อให้อยู่ในตำแหน่งและระนาบที่ต้องการ

3.2.5 นำแท่งพาราฟินที่ได้ไปตัดแต่งให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ให้ชิ้นส่วนพืชอยู่ตรงกลางแล้วนำมาติดกับแท่งไม้ จากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุนโดยตัดเนื้อเยื่อตามยาวหรือตามขวางให้หนา 15 – 18 ไมครอน

3.2.6 นำแถบชิ้นส่วนพืช (paraffin ribbon) ติดลงบนแผ่นสไลด์ด้วยสารละลายยึดเนื้อเยื่อพืช วางแผ่นสไลด์บนเครื่องอุ่นสไลด์ที่อุณหภูมิ 40 ° ซ จนแถบชิ้นส่วนแห้งและติดกับแผ่นสไลด์

3.2.7 ละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อแล้วนำไปย้อมสี ปิดแผ่นสไลด์ด้วยแผ่นปิดสไลด์โดยใช้ Canada balsum

3.2.8 เมื่อสไลด์แห้งสนิท นำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์และบันทึกภาพ

การทดลองที่ 4 การศึกษาเซลล์วิทยา

ศึกษาโครโมโซม จากเนื้อเยื่อปลายรากของพืชทดลองที่ระบุไว้ในการทดลองที่ 2 ตามวิธีการของ Chen (1992)

4.1 วัสดุอุปกรณ์

4.1.1 ขวดแก้วขนาดความจุ 15 มล สำหรับเก็บตัวอย่างปลายราก

4.1.2 แผ่นสไลด์และแผ่นปิดสไลด์

4.1.3 เข็มเขี่ย

4.1.4 ปากคีบ

4.1.5 มีดผ่าตัด

4.1.6 dissecting microscope , stereo microscope และ compound microscope พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

4.1.7 ตะเกียงแอลกอฮอล์

4.1.8 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาโครโมโซม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.1.8.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับหยุดวงชีพเซลล์ (pretreatment solution) ได้แก่ para- dichorobenzene (PDB)

4.1.8.2 สารเคมีที่ใช้เตรียมน้ำยาในการรักษาสภาพเซลล์ (fixative solution) คือ เอทธิล แอลกอฮอร์ 95 % และ glacial acetic acid ในอัตราส่วน 3 : 1 โดยปริมาตร

4.1.8.3 สารเคมีที่ใช้ย่อยแยกเซลล์ออกจากกันคือ 1 N HCl

4.1.8.4 สีที่ใช้ย้อมโครโมโซมคือ carbol fuchsin

4.2 วิธีการ

4.2.1 เก็บปลายรากโดยเลือกจากรากที่กำลังเจริญเติบโต ตัดมาเฉพาะส่วนปลายให้มีความยาว 0.5 ซม.

4.2.2 หยุดการทำงานของเส้นใยสปินเดิลไฟเบอร์โดยการแช่ปลายรากในสารละลาย PDB ที่อุณหภูมิ 5 - 6 ° ซ 30 นาที

4.2.3 นำปลายรากออกมาจากสารละลาย PDB ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปแช่ในสารละลายรักษาสภาพเซลล์ นาน 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ

4.2.4 แยกเซลล์โดยการแช่รากใน 1 N HCl ที่อุณหภูมิ 60 ° ซ 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ

4.2.5 ย้อมเนื้อเยื่อปลายรากใน carbol fuchsin โดยแช่ไว้นาน 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นคีบเนื้อเยื่อวางบนแผ่นสไลด์ หยดสีย้อม 1 หยดตรงบริเวณปลายราก ใช้เข็มเขี่ยขยี้เนื้อเยื่อให้แยกออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ คีบเนื้อเยื่อส่วนเกินทิ้ง ปิดกระจกปิดสไลด์บนบริเวณที่มีเนื้อเยื่อ ใช้กระดาษซับวางบนแผ่นสไลด์เพื่อซับสีที่มากเกินไปออก กดนิ้วหัวแม่มือลงไปเพื่อให้เซลล์อยู่ในระนาบ

4.2.6 นำแผ่นสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมตาเฟสและมีโครโมโซมกระจายไม่ทับกัน นับจำนวนโครโมโซม แล้วบันทึกภาพ

การทดลองที่ 5 การสร้างลูกผสม

5.1 วัสดุอุปกรณ์

5.1.1 ต้นเทียน 2 กลุ่ม

5.1.1.1 ต้นเทียนป่า 8 หมายเลข ได้แก่ หมายเลข IN-RD1 หมายเลข IN-RD2 หมายเลข IN-SP1 หมายเลข IN-SP2 หมายเลข IN-SP3 หมายเลข CD-HL1หมายเลข และหมายเลข CD-HL3

5.1.1.2 ต้นเทียนพันธุ์การค้า 1 ชนิดได้แก่ *Impatiens balsamina*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.2 การจัดคู่ผสม

5.2.1. การผสมตัวเองของเทียนพันธุ์ป่า

5.2.2 การผสมข้าม

5.2.2.1 ระหว่างกลุ่มเทียนพันธุ์ป่า

5.2.2.2 ระหว่างเทียนพันธุ์การค้ากับเทียนพันธุ์ป่า

5.3 วิธีการผสมพันธุ์

5.3.1. การเตรียมดอกที่ใช้เป็นดอกเพศเมีย เลือกดอกที่อยู่ในระยะ4. คือระยะที่ดอกมีการเจริญเติบโตเต็มที่ เฉลี่ยขนาดของดอกตั้งแต่ 0.3 – 0.5 ซม. โดยใช้ใบมีดกรีดลงบนหลังกลีบดอกบน จากนั้นใช้กรรไกรปลายโค้งตัดส่วนปลายของกลีบดอกทั้ง 5 กลีบออก แล้วจึงใช้ปากคีบดึงกลีบดอก ส่วนที่เหลือออกทิ้ง เนื่องจากเกสรเพศผู้คลุมหุ้มปลายเกสรเพศเมียไว้ ต้องใช้เข็มเขี่ย ปลายแหลมขนาดเล็กค่อยๆแกะส่วนซึ่งเป็นก้านชูเกสรเพศผู้ออก เพื่อป้องกันการผสมตัวเอง

5.3.2 เมื่อปลายเกสรเพศเมียบานแยกออกปื้นแฉก ซึ่งเป็นลักษณะที่พร้อมรับการผสม นำเรณูของต้นที่ต้องการจะผสมมาแตะลงบนปลายเกสรเพศเมีย ในช่วงเวลา 8.30 – 10.00 น หลังจากนั้นคลุมดอกที่ได้รับการผสมด้วยถุงที่ทำจากไยรีเมย์ ติดป้ายเพื่อบอกวันที่ผสม พร้อมบันทึกข้อมูล

5.3.3 นำเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 ไปเพาะและปลูกเพื่อทดสอบต่อไป

5.3.4 ศึกษาและคัดเลือกต้นลูกผสมในรุ่นที่ 1

5.4 ศึกษาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอในสภาพปลอดเชื้อ

5.4.1 สิ่งทดลอง เอ็มบริโอจากต้นเทียนลูกผสม จำนวน 18 คู่ผสม

5.4.1.1 อุปกรณ์

5.4.1.1.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ บีกเกอร์ ปิเปตต์ ขวดแก้วพร้อมฝา กระบอกตวง เครื่องชั่งหยาบและละเอียด เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH - meter) หม้อนึ่งความดัน (autoclave)

5.4.1.1.2 เครื่องมือที่ใช้ในการตัดถ่ายเนื้อเยื่อได้แก่ ตู้ปลอดเชื้อ มีดผ่าตัด ปากคีบ ตะเกียงแอลกอฮอล์ และจานแก้ว

5.4.1.1.3 ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ อุณหภูมิ 22 -26 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงประมาณ 1,000 ลักซ์ จากหลอดฟลูออเรสเซ็นต์ ความยาววัน 16 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.4. 2 วิธีการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ

5.4.2.1 นำผลของเทียนลูกผสมที่มี อายุตั้งแต่ 2 ,3,4 , และ 5 สัปดาห์หลังการถ่ายละอองเกสรมาล้างน้ำสะอาดผสมน้ำสบู่ และล้างด้วยน้ำสะอาดอีก 2 ครั้ง ฉีดพ่นฝักอ่อนด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

5.4.2.2 นำฝักอ่อนจุ่มในเอทธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ลนไฟ 2 - 3 วินาที เพื่อทำความสะอาดผิวที่ปกคลุมด้วยขนอีกครั้งเพื่อฆ่าเชื้อและป้องกันการปนเปื้อน วางฝักอ่อนลงบนจานแก้ว ใช้มีดกรีดผลอ่อน นำส่วนของเอ็มบริโอใส่ในขวด ที่ประกอบด้วย อาหารสูตร MS (1962) ดัดแปลงสูตรจำนวน 6 สูตรดังนี้

1. MS + 1 BA + 1 IAA + น้ำมะพร้าว 10 % +วุ้น 6 กรัม + น้ำตาล 30 กรัม
2. ½ MS + 1 BA + 1 IAA + น้ำมะพร้าว 10 % +วุ้น 6 กรัม + น้ำตาล 30 กรัม
3. MS + 0.5 BA + 1 IAA + น้ำมะพร้าว 10 % +วุ้น 6 กรัม + น้ำตาล 30 กรัม
4. ½ MS + 0.5 BA + 1 IAA + น้ำมะพร้าว 10 % +วุ้น 6 กรัม + น้ำตาล 30 กรัม
5. MS + น้ำมะพร้าว 10 % +วุ้น 6 กรัม + น้ำตาล 30 กรัม
6. ½ MS + น้ำมะพร้าว 10 % +วุ้น 6 กรัม + น้ำตาล 30 กรัม
7. ชุดควบคุม (MS + วุ้น 6 กรัม + น้ำตาล30 กรัม)

เลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส

สถานที่ทำการวิจัย ห้องปฏิบัติการทางสรีรวิทยา ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และโรงเรือนวิจัย สถานีเกษตรหลวงอินทนนท์ บ้านขุนกลาง อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

เริ่มวิจัยในเดือน มิ.ย. 2548 และสิ้นสุดการวิจัยในเดือน ก. ค . 2550

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved