บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา มีดังนี้

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 หัวว่านมหาลาภที่มีขนาดเส้นรอบวงประมาณ 10 - 20 เซนติเมตร

1.2 กล้องจุลทรรศน์สองตาแบบสเตอริโอ (stereo microscope)

1.3 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)

1.4 หลอดแก้วสำหรับใส่สารเคมีเพื่อการหยุดการพัฒนาของเซลล์บริเวณปลายยอด (vial)

1.5 เครื่องฝานเนื้อเยื่อ (rotary microtome)

1.6 แผ่นความร้อน (hot plate)

1.7 ตู้อบ (hot air oven)

1.8 แผ่นสไลด์พร้อมที่ปิด (slide and cover slip)

1.9 ขวดแก้วสำหรับย้อมสี (staining jar)

1.10 ขวดแก้วสำหรับทดสอบอายุการใช้งานของช่อดอก

1.11 เครื่องวัดอุณหภูมิและความชื้น (thermohygrometer)

1.12 เครื่องชั่งไฟฟ้า (electrical balance)

1.13 เครื่องชั่งชนิดละเอียด (analytical balance)

1.14 วัสดุอื่นๆ ได้แก่มีดผ่าตัด เวอร์เนีย เชือก ไม้บรรทัด กระดาษสำหรับวาดรูป

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีที่ใช้ศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา (histology)

2.1.1 xylol ของบริษัท Riedel-de Hean AG Seelze-Hanover, West Germany.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.2 พาราพลาสท์ ของ บริษัท BHD Chemical Ltd., Poole, England.

2.1.3 สี haematoxylin ของบริษัท Hartman - Leddon Company, Phila, PA. Harleco U.S.A.

2.1.4 ethyl alcohol absolute ของบริษัท Groupo Montedison Farmitalia Carloeba, S.P.A.

2.1.5 ethanol ของบริษัทRiedel-de Hean AG Seelze-Hanover, West Germany.

2.1.6 tertiary butyl alcohol ของบริษัท Groupo Montedison Farmitalia Carloeba, S.P.A.

2.1.7 Canada balsam ของบริษัท Merck, E. Merck D-61 Darmstadt, West Germany.

2.1.8 FAA (formalin-aceto-alcohol) ประกอบด้วย

50 % ethyl alcohol	90 %
glacial acetic acid	5 %
formalin	5 %

2.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับแช่ก้านดอก เพื่อการพัฒนาของช่อดอก มีดังนี้

2.2.1 น้ำกลั่น

2.2.2 น้ำตาลทราย (sucrose)

2.2.3 8 - hydroxyquinoline sulphate (8 - HQS) ของบริษัท Ajax Chemical Ltd., Sydney-Melbourne, Australia.

3. การเตรียมตัวอย่าง สำหรับศึกษาการเริ่มกำเนิดและการพัฒนาของตาดอกและช่อดอกขณะที่อยู่ในหัว

ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำหัวว่านมหาลาภ ซึ่งปลูกเลี้ยงในสภาพธรรมชาติ ที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เชียงใหม่ มาสัปดาห์ละ 10 หัว ทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลาง เส้นรอบวงของหัว นับจำนวนใบ และทำการแกะ (dissecting) กาบใบ (scale) ที่ประกอบขึ้นเป็นหัวออกที่ละชั้น เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นระหว่างกาบใบแต่ละชั้น แกะกาบใบออกจนกระทั่งถึงชั้นของใบอ่อนที่พัฒนายังไม่เต็มที่ (young unexpanded leaf) เมื่อหมดชั้นของใบอ่อนที่พัฒนายังไม่เต็มที่แล้ว นำไปศึกษาใต้กล้องสองตาแบบสเตอริโอ สัปดาห์ละหนึ่งครั้ง ครั้งละ 5 หัว อีก 5 หัว นำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อบริเวณปลายยอด (shoot apex) ในระยะที่มีการเปลี่ยนแปลงทางรูปพรรณสัณฐานโดยใช้วิธี paraffin embedding method โดยตรึงเนื้อเยื่อส่วนยอดที่ต้องการศึกษาในน้ำยา FAA (formalin - aceto - alcohol) แล้วทำการ infiltrate โดยใช้ tertiary butyl alcohol ทำการฝานเนื้อเยื่อ โดยใช้เครื่องฝานเนื้อเยื่อแบบใช้มือหมุน (rotary microtome) และย้อมสีด้วยวิธี haemotoxylin technique ดังบรรยายไว้โดย Johansen (1940)

4. การเตรียมสารละลายเคมีเพื่อการพัฒนาของช่อดอกภายหลังตัดออกจากต้น

สารละลายเคมีที่ใช้ในการศึกษาการพัฒนาของช่อดอกที่ตัดจากต้นแล้ว มีส่วนผสมของ น้ำตาลทรายขาว และ 8 - HQS โดยมีน้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย ในสารละลายนี้มีส่วนผสมของน้ำตาลทรายขาวต่างกัน 4 ระดับ คือ 2 5 10 และ 15 เปอร์เซนต์ และในสารละลายทุกระดับของน้ำตาล มีส่วนผสมของ 8 - HQS 300 ส่วนต่อล้านส่วน (สตล.)

ทำการชั่งน้ำตาลทรายขาว และ 8 - HQS ตามที่กำหนดในตารางที่ 1 เพื่อให้ความเข้มข้นของสารละลายเคมีแต่ละสูตร เป็นไปตามที่วางแผนการทดลองไว้ นำสารแต่ละชนิดมาละลายในน้ำกลั่น ให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,500 มิลลิลิตร ในทุกระดับความเข้มข้นของน้ำตาล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 ปริมาณน้ำตาลทราย และ 8 - hydroxyquinoline sulphate (8-HQS) ที่ใช้ในสารละลายเคมีแต่ละระดับที่ปริมาตร 1,500 มิลลิลิตร

ความเข้มข้นของน้ำตาลทราย (%)	ปริมาณน้ำตาลทรายที่ใช้ (กรัม)	ปริมาณ 8 - HQS ที่ใช้ที่ความเข้มข้น 300 สตล. (มิลลิกรัม)
2	30	450
5	75	450
10	150	450
15	225	450

5. วิธีการศึกษา

ทำการศึกษาโดยแยกออกเป็น 2 การทดลอง คือ

5.1. การทดลองที่ 1 ศึกษาการเริ่มกำเนิดและการพัฒนาของดอกและช่อดอกขณะที่อยู่ในหัว มีรายละเอียด ดังนี้

5.1.1 พืชทดลอง

นำหัวของว่านมหาลาภที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ โดยเป็นหัวที่ได้จากต้นที่ปลูกจากหัวที่ใช้เริ่มต้นที่มีขนาดเดียวกัน ซึ่งปลูกไว้ที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ สัปดาห์ละ 10 หัว มาศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปพรรณสัณฐาน ของปลายยอด (shoot apex) ภายใต้กล้องจุลทัศน์สองตาแบบสเตอริโอ

5.1.2 วิธีการ

การทดลองนี้เป็นการศึกษาโดยวิธีการสังเกตการเปลี่ยนแปลงรูปพรรณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สัณฐานของปลายยอดของว่านมหาลาภ สัปดาห์ละ 1 ครั้ง ตั้งแต่วันที่ 2 กรกฎาคม 2529 ไปจนกระทั่งถึงวันที่ 25 กุมภาพันธ์ 2530 โดยเริ่มแรกจะทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลาง และเส้นรอบวงของหัว ความยาวใบ นับจำนวนใบจริงที่ปรากฏในขณะนั้นและจำนวนหัวย่อย เมื่อวัดเสร็จใช้มีดผ่าตัดแกะกาบใบ ที่ประกอบกันขึ้นเป็นหัวออกทีละชั้น เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นระหว่างกาบใบแต่ละชั้น แกะกาบใบออกจนกระทั่งถึงชั้นของใบอ่อน ที่พัฒนายังไม่เต็มที่แล้วนำไปศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์สองตาแบบสเตอริโอ โดยแกะใบอ่อนที่พัฒนายังไม่เต็มที่ออกหมดด้วยมีดที่มีความบางและคม ซึ่งทำได้โดยการตัดใบมีดโกนเป็นชิ้นเล็กๆยึดเข้ากับด้ามเข็มเขี่ย เมื่อถึงชั้นของจุดกำเนิดใบเห็นบริเวณปลายยอด จึงวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของปลายยอดตรงฐานที่อยู่ระหว่างโคนจุดกำเนิดใบ วาดรูปลายเส้นแสดงลักษณะของปลายยอด ตั้งแต่เริ่มทำการศึกษาไปจนกระทั่งมีการเปลี่ยนแปลง จากระยะการเจริญเติบโตทางใบ ไปเป็นระยะของการเจริญพันธุ์และพัฒนาไปเป็นช่อดอกที่สมบูรณ์อยู่ในหัว ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาในระยะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลง ทางรูปพรรณสัณฐานของบริเวณปลายยอด โดยนำเอาหัวว่านมหาลาภที่แกะกาบใบชั้นนอกๆออก จนเหลือใบอ่อนที่พัฒนายังไม่เต็มที่ชั้นในสุด ตัดเอาส่วนของยอดและส่วนของ basal plate ซึ่งมีใบอ่อนที่พัฒนายังไม่เต็มที่ติดอยู่ ให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมหนา 2 - 5 มิลลิเมตร แล้วทำการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา โดยใช้ paraffin embedding technique โดยวิธีของ Johansen (1940) แล้วนำไปฝานเป็นชิ้นบางๆ ทั้งฝานตามยาว และฝานตามขวาง ให้ชิ้นฝานมีความหนา 0.08 - 0.10 มิลลิเมตร โดยใช้เครื่องฝานชิ้นเนื้อเยื่อ แล้วนำชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้ไปย้อมสีเพื่อตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ ในขณะที่มีการเปลี่ยนแปลงทางรูปพรรณสัณฐานของบริเวณปลายยอด

5.1.3 การบันทึกผล

แต่ละครั้งของการศึกษาได้บันทึกข้อมูลต่างๆ ดังนี้

5.1.3.1 เส้นผ่าศูนย์กลางของหัวบริเวณที่กว้างที่สุด

5.1.3.2 เส้นรอบวงของหัวบริเวณที่กว้างที่สุด

5.1.3.3 จำนวนใบที่คลี่เต็มที่แล้ว

5.1.3.4 ความยาวของใบจาก basal plate ถึงปลายใบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.1.3.5 เส้นผ่าศูนย์กลางของปลายยอดวัดที่บริเวณฐานที่อยู่ระหว่างโคนจุดกำเนิดใบ

5.1.3.6 เวลาที่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลง

5.1.3.7 ระยะเวลาที่ใช้สำหรับการพัฒนาช่อดอกภายในหัว นับจากเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของปลายยอด

5.1.3.8 วาดรูปลายเส้นแสดงลักษณะของปลายยอดประกอบการบันทึกข้อมูลของการเปลี่ยนแปลงของปลายยอด

5.1.3.9 ถ่ายภาพเพื่อแสดงลักษณะต่างๆ

5.2 **การทดลองที่** 2 การศึกษาการพัฒนาของช่อดอกภายหลังการตัดจากต้น ในระยะการพัฒนาที่ต่างๆกันของดอกย่อยในช่อดอก

5.2.1 พืชทดลอง

ช่อดอกของว่านมหาลาภที่ได้จากการปลูกในสภาพธรรมชาติที่มีระยะการพัฒนาที่ต่างกันของดอกย่อยในช่อดอก 3 ระยะ คือ

ระยะพัฒนาที่ 1 ดอกย่อยทุกดอกยังคงเป็นดอกตูม

ระยะพัฒนาที่ 2 ดอกย่อยในช่อดอกบานเพียง 2 ดอก

ระยะพัฒนาที่ 3 ดอกย่อยในช่อดอกบานได้ 4 ดอก

5.2.2 วิธีการ

การศึกษาการพัฒนาของช่อดอกภายหลังการตัดจากต้น ในระยะที่ดอกย่อยในช่อดอกนั้นมีการพัฒนาที่ต่างกัน ทำโดยการนำช่อดอกของว่านมหาลาภที่มีระยะการบานของดอกย่อยในช่อดอกต่างๆกัน มาแช่โคนก้านในขวดแก้วไว้ในห้องปฏิบัติการ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่วันที่ 26 มีนาคม 2530 ถึงวันที่ 11 เมษายน 2530 โดยทำการตัดก้านให้ยาวประมาณ 50 เซนติเมตร แล้วนำไปชั่งน้ำหนักสดก่อนที่จะนำไปแช่สารละลายเคมี ที่มีส่วนผสมของน้ำตาลทราย 4 ระดับความเข้มข้น คือ 2 5 10 และ 15 เปอร์เซนต์ และ 8 - HQS 300 ส่วนต่อล้าน เป็นสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่จะมีผลทำให้ก้านของช่อดอกเน่า โดยมีระเบียบวิธีการวิจัย ดังนี้ คือ ทำการวาง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แผนการทดลองแบบทดลองสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) โดยจัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียล (factorial) จำนวน 3 x 5 = 15 กรรมวิธี โดยแต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 = ช่อดอก

กรรมวิธีที่ 1 ช่อดอกระยะพัฒนาที่ 1 แช่ในน้ำกลั่น

กรรมวิธีที่ 2 ช่อดอกระยะพัฒนาที่ 1 แช่ในสารละลายที่มีน้ำตาลทราย 2 % ผสมกับ 8 - HQS 300 ส่วนต่อล้าน

กรรมวิธีที่ 3 ช่อดอกระยะพัฒนาที่ 1 แช่ในสารละลายที่มีน้ำตาลทราย 5 % ผสมกับ 8 - HQS 300 ส่วนต่อล้าน

กรรมวิธีที่ 4 ช่อดอกระยะพัฒนาที่ 1 แช่ในสารละลายที่มีน้ำตาลทราย 10 % ผสมกับ 8 - HQS 300 ส่วนต่อล้าน

กรรมวิธีที่ 5 ช่อดอกระยะพัฒนาที่ 1 แช่ในสารละลายที่มีน้ำตาลทราย 15 % ผสมกับ 8 - HQS 300 ส่วนต่อล้าน

กรรมวิธีที่ 6 ช่อดอกระยะพัฒนาที่ 2 แช่ในน้ำกลั่น

กรรมวิธีที่ 7 ช่อดอกระยะพัฒนาที่ 2 แช่ในสารละลายที่มีน้ำตาลทราย 2 % ผสมกับ 8-HQS 300 ส่วนต่อล้าน

กรรมวิธีที่ 8 ช่อดอกระยะพัฒนาที่ 2 แช่ในสารละลายที่มีน้ำตาลทราย 5 % ผสมกับ 8-HQS 300 ส่วนต่อล้าน

กรรมวิธีที่ 9 ช่อดอกระยะพัฒนาที่ 2 แช่ในสารละลายที่มีน้ำตาลทราย 10% ผสมกับ 8-HQS 300 ส่วนต่อล้าน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 10 ช่อดอกระยะพัฒนาที่ 2 แช่ในสารละลายที่มีน้ำตาลทราย 15% ผสมกับ 8-HQS 300 ส่วนต่อล้าน

กรรมวิธีที่ 11 ช่อดอกระยะพัฒนาที่ 3 แช่ในน้ำกลั่น

กรรมวิธีที่ 12 ช่อดอกระยะพัฒนาที่ 3 แช่ในสารละลายที่มีน้ำตาลทราย 2 % ผสมกับ 8-HQS 300 ส่วนต่อล้าน

กรรมวิธีที่ 13 ช่อดอกระยะพัฒนาที่ 3 แช่ในสารละลายที่มีน้ำตาลทราย 5 % ผสมกับ 8-HQS 300 ส่วนต่อล้าน

กรรมวิธีที่ 14 ช่อดอกระยะพัฒนาที่ 3 แช่ในสารละลายที่มีน้ำตาลทราย 10% ผสมกับ 8-HQS 300 ส่วนต่อล้าน

กรรมวิธีที่ 15 ช่อดอกระยะพัฒนาที่ 3 แช่ในสารละลายที่มีน้ำตาลทราย 15% ผสมกับ 8-HQS 300 ส่วนต่อล้าน

5.2.3 การบันทึกผล

5.2.3.1 ชั่งน้ำหนักสดของช่อดอกก่อนการทดลอง และทุกๆ 2 วันในระหว่างทำการทดลอง

5.2.3.2 บันทึกจำนวนดอกทั้งหมดในช่อเมื่อเริ่มทำการทดลอง

5.2.3.3 บันทึกจำนวนดอกบานในแต่ละวัน

5.2.3.4 บันทึกจำนวนดอกร่วง

5.2.3.5 สังเกตุการเปลี่ยนแปลงของสีดอกระหว่างการทดลอง

5.2.3.6 บันทึกจำนวนดอกบานต่อช่อ

5.2.3.7 บันทึกอายุการปักแจกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved