ภาคผนวก

ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อทำการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

1. การฆ่า (killing) และ ตรึงเซลล์ (fixative) ทำโดยนำเนื้อเยื่อของพืชที่ต้องการศึกษามาแช่ในน้ำยา FAA นาน 7 วันสำหรับออวุลอายุ 0-7 วันหลังผสมเกสร (เนื้อเยื่ออ่อน) และนาน 14 วันสำหรับเนื้อเยื่ออายุมากกว่า 7 วันหลังผสมเกสร (เนื้อเยื่อแข็ง) เพื่อให้โปรโตพลาสซึม (protoplasm) ภายในเซลล์หยุดขบวนการต่างๆ และมีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุดสามารถเก็บรักษาเนื้อเยื่อไว้ใกล้เคียงปกติ

สูตรน้ำยา Fixative FAA (Formalin-acetic acid)

Ethyl alcohol 70 เปอร์เซ็นต์	90 มิลลิลิตร
glacial acetic acid	5 มิลลิลิตร
Formalin	5 มิลลิลิตร

ในการแช่น้ำเยื่ออ่อน ควรแช่ไว้ 24 ชั่วโมง
เนื้อเยื่อแข็ง ควรแช่ไว้ 2 วัน

2. ขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยนำเนื้อเยื่อที่ผ่านขั้นตอนที่ 1 แช่ในน้ำยาที่ใช้ในการดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยให้ผ่านน้ำยาที่เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของน้ำยา 50-100 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงไว้ข้างต้น ตามขั้นตอนต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 1 แช่ในน้ำยา 50 เปอร์เซ็นต์	ทิ้งไว้ 1 คืน
ขั้นตอนที่ 2 แช่ในน้ำยา 70 เปอร์เซ็นต์	ทิ้งไว้ 1 คืน
ขั้นตอนที่ 3 แช่ในน้ำยา 85 เปอร์เซ็นต์	ทิ้งไว้ 1 คืน
ขั้นตอนที่ 4 แช่ในน้ำยา 95 เปอร์เซ็นต์	ทิ้งไว้ 1 คืน
ขั้นตอนที่ 5 แช่ในน้ำยา 100 เปอร์เซ็นต์ + erythrosine	ทิ้งไว้ 1 คืน
ขั้นตอนที่ 6 แช่ใน Tertiary butyl alcohol (TBA) 100 เปอร์เซ็นต์	ทิ้งไว้ 1 คืน (เปลี่ยน 3 ครั้ง)
ขั้นตอนที่ 7 แช่ใน TBA+ liquid paraffin 1:1	ทิ้งไว้ 1 คืน หรือมากกว่านั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวกที่ 1 สูตรน้ำยาดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating reagent)

น้ำยาเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์)	50	70	85	95	100
น้ำกลั่น	50	30	15	-	-
95 เปอร์เซ็นต์ ethyl alcohol	40	50	50	45	-
Tertiary butyl alcohol (TBA)	10	20	35	55	75
Absolute alcohol	-	-	-	-	25

3. การฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน (embedding)

นำเนื้อเยื่อมาฝังในพาราฟิน ซึ่งเมื่อแข็งตัวจะทำให้เนื้อเยื่อคงรูปร่างของเซลล์ไว้ และรับคมมีดได้ขณะที่ทำการฝังเนื้อเยื่อควรไล่ฟองอากาศที่เกิดขึ้นขณะที่พาราฟินยังไม่แข็งตัวให้หมดโดยใช้เข็มเขี่ยลนไฟให้ร้อนไล่ฟองอากาศดังกล่าวพร้อมจัดตำแหน่งของเนื้อเยื่อในระนาบที่สามารถนำไปตัดได้ตามจุดประสงค์ ปล่อยให้พาราฟินแข็งตัว เนื้อเยื่อจะพร้อมที่จะนำไปตัดได้ ก่อนนำไปตัดทำการแต่งแท่งพาราฟินให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า โดยมีชิ้นเนื้อเยื่ออยู่ตรงกลางหลัง จากนั้นนำไปติดกับแท่งไม้ที่มีขนาด 1.5 ×1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่อิ่มตัวด้วยพาราฟิน

4. การตัดเนื้อเยื่อทำโดยนำแท่งพาราฟินไปติดบนเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบมือหมุน (rotary microtome) โดยเนื้อเยื่ออายุ 0-7 วันหลังผสมเกสร ให้ตัดชิ้นส่วนให้มีความหนา 15 ไมครอน สำหรับเนื้อเยื่ออายุมากกว่า 7 วัน ให้ตัดชิ้นส่วนให้มีความหนา 25 ไมครอน ชิ้นส่วนที่ตัดแล้วจะออกมาเป็นแผ่นต่อกันเป็นแถบยาว การตัดควรให้แถบยาวดังกล่าวออกมาเป็นแผ่นตรง และมีความยาวติดต่อกันไม่ฉีกขาด นำแผ่นที่ตัดได้วางบนที่รองรับ เลือกเนื้อเยื่อตรงตามที่ต้องการ โดยใช้มีดคม ๆ ตัดแผ่นต่อกันเป็นแถบยาวออกมาเพื่อนำไปวางบนแผ่นสไลด์ต่อไป

5. การติดแผ่นจากแถบที่ตัดได้กับแผ่นสไลด์ นำแผ่นสไลด์ที่สะอาดวางบนที่เรียบ แล้วหยดน้ำยายึดแผ่นดังกล่าว ลงบนสไลด์ประมาณ 2 - 3 หยด จากนั้นใช้พู่กันแตะแผ่นต่อกันเป็นแถบยาวที่ตัดแบ่งวางบนสไลด์ แล้วนำแผ่นสไลด์ไปวางบนเครื่องอุ่นแผ่นสไลด์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 24 ชั่วโมง หรือ 2-3 วัน

ขั้นตอนการเตรียมน้ำยายึดแผ่นจากแถบที่ตัดได้บนแผ่นสไลด์

1. ตีไข่ขาวจนข้น
2. ตักเอาฟองอากาศออก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. ไข่ขาวจาก ข้อ 2 + น้ำ อัตราส่วน 1: 50
4. จากข้อ 3 นำมา 100 มิลลิลิตร + Sodium benzoate 0.5-1 มิลลิกรัม
5. กรองกระดาษจากข้อ 4 ด้วยสำลี
6. เก็บน้ำยาเข้มข้นในข้อ 5 ที่อุณหภูมิน้อยกว่า หรือ 15 องศาเซลเซียส
7. เจือจางน้ำยาเข้มข้นด้วยน้ำกลั่น 1:50 หรือมากกว่านั้น ก่อนนำไปใช้

6. การย้อมสีสไลด์ นำสไลด์ที่ติดเนื้อเยื่อแล้วมาย้อมสีโดยผ่านสไลด์ในน้ำยาตามขั้นตอนต่อไปนี้ ให้สไลด์อยู่ในน้ำยาในแต่ละขวดย้อม (staining jar) เป็นเวลานาน 3-5 นาที

7.1. Xylene
7.2. Xylene + Ethyl alcohol 1:1
7.3. Ethyl alcohol + Ether 1:1
7.4. Ethyl alcohol 95 เปอร์เซ็นต์
7.5. Ethyl alcohol 70 เปอร์เซ็นต์
7.6. Ethyl alcohol 50 เปอร์เซ็นต์
7.7. Ethyl alcohol 30 เปอร์เซ็นต์
7.8. Hematoxylin dye 3-10 นาที
7.9. น้ำสะอาด 3-5 นาที
7.10. Ethyl alcohol 30 เปอร์เซ็นต์
7.11. Ethyl alcohol 50 เปอร์เซ็นต์
7.12. Ethyl alcohol 70 เปอร์เซ็นต์
7.13. Ethyl alcohol 95 เปอร์เซ็นต์
7.14. Ethyl alcohol 100 เปอร์เซ็นต์
7.15. Ethyl alcohol 100 เปอร์เซ็นต์ + Xylene 1:1
7.16. Xylene

หลังจากนั้นนำแผ่นสไลด์มาวางบนกระดาษ ปล่อยให้แผ่นสไลด์แห้ง เพื่อที่จะเตรียมปิดแผ่นกระจก (cover slip)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7. การปิดแผ่นกระจก (mounting)

นำสไลด์ที่แห้งแล้วมาทำความสะอาดภายใต้กล้อง โดยใช้ปลายมีดเบอร์ 11 เขี่ยเศษขยะหรือเศษเนื้อเยื่อในส่วนที่ไม่ต้องการทิ้ง เมื่อสไลด์สะอาดแล้วจึงนำแผ่นกระจกมาปิดทับโดยหยด Canada balsam บนแผ่นสไลด์ 1-2 หยดแล้วนำแผ่น cover slip ปิดทับลงไป เมื่อแผ่นสไลด์แห้งสนิทจึงนำแผ่นสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และถ่ายรูป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 2 ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเข้มข้นซูโครสในน้ำยาเลี้ยงละอองเกสรเปอร์เซ็นต์ต่อความมีชีวิตของละอองเกสรของปทุมมาสายพันธุ์ "Chiang Mai Pink"

Source of variation	df	SS	MS	F	P
Between Groups	3	5190.23	1730.08	5.38	*
Within Groups	37	11900.54	321.64		
Total	40	17090.77			

ตารางภาคผนวกที่ 3 ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเข้มข้นซูโครส และอายุคัพภะต่อค่าจำนวนรากต่อต้นของลูกผสม C-28 × CMP

Source of variation	df	SS	MS	F	P
Age(A)	2	714.52	357.25	11.26	*
Sucrose(S)	3	95.09	31.70	1.00	NS
A × S	6	219.48	36.58	1.15	NS
Error	108	3425.90	31.72		
Total	119	4454.99			

หมายเหตุ วิเคราะห์ 10 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวกที่ 4 ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเข้มข้นซูโครส และอายุดัพภะต่อจำนวนยอดต่อต้นของลูกผสม C-28 × CMP

Source of variation	df	SS	MS	F	P
Age(A)	2	4.65	2.33	9.66	*
Sucrose(S)	3	1.33	0.44	1.85	NS
A × S	6	3.22	0.54	2.23	*
Error	108	26.00	0.24		
Total	119	35.20			

หมายเหตุ วิเคราะห์ 10 ซ้ำ

ตารางภาคผนวกที่ 5 ผลผลวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเข้มข้นซูโครส และอายุดัพภะต่อความสูงของยอดของลูกผสม C-28 × CMP

Source of variation	df	SS	MS	F	P
Age(A)	2	98.409	49.20	9.35	*
Sucrose(S)	3	34.62	11.54	2.19	NS
A × S	6	63.99	10.66	2.03	NS
Error	108	568.13	5.26		
Total	119	765.15			

หมายเหตุ วิเคราะห์ 10 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวกที่ 6 ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเข้มข้นcasein hydrolysate และอายุคัพภะต่อจำนวนรากต่อต้นของลูกผสม C-28 × CMP

Source of variation	df	SS	MS	F	P
Age(A)	2	786.52	363.26	11.58	*
casein hydrolysate(C)	3	60.29	20.10	0.64	NS
A × C	6	82.28	13.71	0.44	NS
Error	108	3388.70	31.38		
Total	119	4257.79			

หมายเหตุ วิเคราะห์ 10 ซ้ำ

ตารางภาคผนวกที่ 7 ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเข้มข้นcasein hydrolysate และอายุคัพภะต่อจำนวนยอดต่อต้น ของลูกผสม C-28 × CMP

Source of variation	df	SS	MS	F	P
Age(A)	2	3.80	1.90	7.95	*
casein hydrolysate(C)	3	1.17	0.39	1.63	NS
A × C	6	0.53	0.09	0.37	NS
Error	108	25.80	0.24		
Total	119	31.30			

หมายเหตุ วิเคราะห์ 10 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวกที่ 8 ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเข้มข้นcasein hydrolysate และอายุคัพภะต่อความสูงของยอดของลูกผสม C-28 × CMP

Source of variation	df	SS	MS	F	P
Age(A)	2	34.06	17.03	5.92	*
casein hydrolysate(C)	3	4.21	1.40	0.49	NS
A × C	6	10.90	1.82	0.63	NS
Error	108	310.87	2.88		
Total	119	360.04			

หมายเหตุ วิเคราะห์ 10 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายอัครา สุทรารมณ์ลักษณ์
ที่อยู่ที่ติดต่อได้	74 หมู่ 4 ตำบลสันกลาง อำเภอสันกำแพง จังหวัดเชียงใหม่ 50130
วัน เดือน ปี เกิด	24 สิงหาคม 2524

ประวัติการศึกษา

- สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนปรินส์รอยแยลส์วิทยาลัย อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2539
- สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนปรินส์รอยแยลส์วิทยาลัย อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2542
- สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2546

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved