บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการ

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 พืชทดลอง

หัวพันธุ์ปทุมมาในสภาพพักตัว จากศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.หางดง จ.เชียงใหม่ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8-12 มม 13-17 มม และ 18-22 มม ซึ่งเป็นปทุมมาที่คัดเลือกแล้ว มีกาบรองดอกสีม่วงที่มีขนาดกว้างกว่าพันธุ์พื้นเมืองทั่ว ๆ ไป

1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการตัดชิ้นส่วนพืช เพื่อการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

1.2.1 เครื่องตัดชิ้นส่วนพืชแบบล้อหมุน (rotary microtome) ของ Leitz Wetzlar type 1212

1.2.2 แท่งไม้ขนาด 1.5 x 1.5 x 1.5 ลบ ซม ที่ต้มให้อิ่มตัวในพาราฟิน

1.2.3 เครื่องอุ่นสไลด์ (hot plate)

1.2.4 ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ระดับอุณหภูมิ 35 °ซ และระดับอุณหภูมิ 56 °ซ

1.2.5 กระจกสไลด์ และกระจกปิดสไลด์ ขนาด 22 x 22 มม

1.3 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมชิ้นส่วนพืชและสไลด์ถาวร

1.3.1 น้ำยาเคมีที่ใช้ในการฆ่าเซลและรักษาสภาพเซล (killing and fixing solution) ได้แก่ F.A.A.(Formalin-Acetic acid -Alcohol) มีส่วนผสมของสารเคมี ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ethyl alcohol (95 %) 50 มล

glacial acetic acid 5 มล

formaldehyde (37-40 %) 10 มล

น้ำกลั่น 35 มล

1.3.2 น้ำยาเคมีที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซล (dehydrating solution) ประกอบด้วย 95 % ethyl alcohol absolute alcohol tertiary butyl alcohol (T.B.A) และน้ำกลั่น โดยผสมไว้เป็นอัตราส่วนต่าง ๆ 4 ระดับ ตามวิธีของ Sass (1966) ซึ่งมีส่วนผสม ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 อัตราส่วนของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซล

grade	95 % ethyl alcohol (มล)	absolute alcohol (มล)	T.B.A. (มล)	น้ำกลั่น (มล)
70 %	50	-	20	30
85 %	50	-	35	15
95 %	50	-	50	-
100 %	-	25	75	-

1.3.3 สารตัวกลางที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อ (embedding media) ได้แก่ paraplast

1.3.4 น้ำยายึดเนื้อเยื่อพืชให้ติดแผ่นสไลด์ (adhesive) ใช้ albumin

1.3.5 น้ำยาทำให้เนื้อเยื่อใสสะอาด (clearing reagent) คือ xylol [$C_6H_4(CH_4)_2$]

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3.6 สีย้อมเนื้อเยื่อ ใช้ Delafield's hematoxylin ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมของ

aluminium sulfate [$Al_2(SO_4)_3 . 16H_2O$]	400	มล
hematoxylin ($C_{16}H_{14}O_6$)	4	ก
95 % ethyl alcohol	25	มล
methyl alcohol	100	มล
glycerol	100	มล

1.3.7 สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นสไลด์ ใช้ canada balsam (Merck)

1.4 กล้องจุลทรรศน์ (stereo dissecting microscope และ stereo microscope) และกล้องถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์

1.5 แผ่นเทียบสี Nickerson color fan ของบริษัท Munsell Color Co.Inc, Maryland

2. วิธีการทดลอง

ทำการศึกษา โดยแยกเป็น 3 งานทดลอง คือ

2.1 การพัฒนาของช่อดอก และดอกย่อย

หัวพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองเป็นหัวพันธุ์ขนาด 18-22 มม ที่สิ้นสุดระยะการพักตัวแล้ว และเป็นหัวพันธุ์ที่ตัดรากสะสมอาหารออกจนหมดทุกราก ปลูกหัวพันธุ์ในสภาพธรรมชาติ โดยใช้ระยะปลูก 30 x 30 ซม นำพืชทดลองที่เติบโตจากหัวพันธุ์ มาศึกษาการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาการของปลายยอดของหน่อแรกในระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดภายใต้กล้องจุลทรรศน์สองตา จนกระทั่งปลายยอดเปลี่ยนไปเป็นช่อดอกที่สมบูรณ์อยู่ภายในโคนใบที่ห่อหุ้มกันเป็นชั้น ๆ ทำการบันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.1.2 ศึกษาเนื้อเยื่อวิทยา (histology) ของปลายยอดในขณะที่มีพัฒนาการของช่อดอกและดอกย่อยในระยะต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค paraffin embedding ตามวิธีการของ Johansen (1940) และ Sass (1966)

2.1.3 ศึกษาโครงสร้างของช่อดอกและดอกย่อย พร้อมทั้งวาดภาพลายเส้นแสดงส่วนต่าง ๆ ของช่อดอกและดอกย่อย ตามวิธีการของ Porter (1967)

การศึกษาในข้อ 2.1 ในแต่ละหัวข้อย่อยใช้ต้นพืชทดลอง จำนวน 5 ต้นต่อครั้ง โดยสุ่มต้นพืชทดลองจากแปลงปลูก

2.2 ผลของขนาดของหัวพันธุ์ที่มีต่อการเจริญเติบโตของต้น และการพัฒนาของดอก

ศึกษาผลของขนาดของหัวพันธุ์ โดยใช้หัวพันธุ์ 3 ขนาด คือ

ขนาดใหญ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 18 - 22 มม

ขนาดกลาง เส้นผ่าศูนย์กลาง 13 - 17 มม และ

ขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลาง 8 - 12 มม

หัวพันธุ์เหล่านี้เป็นหัวพันธุ์ที่หมดระยะพักตัวแล้วและตัดเอาส่วนของรากสะสมอาหารออกจนหมด ใช้หัวพันธุ์แต่ละขนาดจำนวน 180 หัว วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อคสมบูรณ์ ทำ 5 ซ้ำ ปลูกหัวพันธุ์ในสภาพธรรมชาติโดยใช้ระยะปลูก 30 x 30 ซม

เมื่อหัวพันธุ์มีการเจริญเติบโตทำการบันทึกการเจริญเติบโตของต้นดังต่อไปนี้

2.2.1 ความสูงของต้นจากผิวดินจนถึงส่วนปลายของใบที่ยาวที่สุด บันทึกทุกสัปดาห์จากวันเริ่มปลูก จนกระทั่งได้ความสูงสูงสุด

2.2.2 จำนวนหน่อต่อต้น

2.2.3 จำนวนใบของหน่อแรก และจำนวนใบต่อต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.4 อายุของต้นถึงวันเริ่มกำเนิดดอก วันแทงช่อดอก และวันตัดดอกของช่อดอกจากหน่อแรก

2.2.5 จำนวนช่อดอกต่อต้น

2.2.6 คุณภาพของช่อดอก ได้แก่ ขนาดของช่อดอก และจำนวนกาบรองดอกต่อช่อ

2.3 อิทธิพลของรากสะสมอาหารต่อการเจริญเติบโตของต้น และการพัฒนาของดอก

ศึกษาอิทธิพลของรากสะสมอาหาร จากหัวพันธุ์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 18-22 มม ที่มีรากสะสมอาหารหัวละ 0 1 2 หรือ 3 ราก โดยใช้หัวพันธุ์อย่างละ 144 หัว วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อคสมบูรณ์ ทำ 4 ซ้ำ โดยปลูกหัวพันธุ์ในสภาพธรรมชาติ ใช้ระยะปลูก 30 x 30 ซม บันทึกการเจริญเติบโตของต้นเช่นเดียวกับ 2.2

3. สถานที่ที่ใช้ในการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

3.1 แปลงปลูกพืชทดลอง ของภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่มีสภาพและความอุดมสมบูรณ์ของดิน ดังแสดงไว้ในตารางผนวกที่ 1 ในภาคผนวก โดยแสดงสภาพภูมิอากาศไว้ในตารางผนวกที่ 2

3.2 ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน และภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

4. ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

เริ่มทำการวิจัยเมื่อวันที่ 12 เมษายน 2532 สิ้นสุดการวิจัยเมื่อวันที่ 5 ตุลาคม 2532

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved