บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 พืชทดลอง คือ ว่านแสงอาทิตย์ จากศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

หัวของว่านแสงอาทิตย์ที่ใช้ศึกษาทดลอง มี 3 ขนาดคือ หัวที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.01-6.00 6.01-7.00 และ 7.01- 8.00 ซม

1.2 วัสดุและอุปกรณ์ เพื่อใช้ในการปลูกและขยายพันธุ์พืชทดลอง

1.2.1 วัสดุปลูก คือ ดิน ขี้เถ้าแกลบ และเปลือกถั่ว ในอัตราส่วน 2:1:1

1.2.2 ถุงพลาสติกสีดำ ขนาดกว้าง 6 นิ้ว

1.2.3 วัสดุเพาะชำ คือ ทรายและขี้เถ้าแกลบ ในอัตราส่วน 1:1

1.2.4 กระบะพลาสติก

1.2.5 สายยางรดน้ำพร้อมฝักบัว

1.2.6 ถุงกระดาษ

1.2.7 พู่กัน

1.2.8 อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ มีด ไม้บรรทัด เวอร์เนียคาลิปเปอร์ เครื่องชั่งไฟฟ้า เชือกสีต่างๆ และ กล้องถ่ายรูป

1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

1.3.1 ขวดพลาสติกขนาดเล็ก และหลอดแก้ว (vial) สำหรับใส่น้ำยาเคมี และเนื้อเยื่อตัวอย่าง

1.3.2 ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ระดับ 56 °ซ

1.3.3 เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุน (rotary microtome)

1.3.4 แท่งไม้ขนาด 3.5 ลบ.ซม ที่ผ่านการต้มให้อิ่มตัวในพาราฟิน

1.3.5 แผ่นสไลด์พร้อมแผ่นปิดสไลด์

1.3.6 แผ่นความร้อนสำหรับอุ่นสไลด์

1.3.7 ขวดแก้วสำหรับย้อมสีเนื้อเยื่อ

1.3.8 กล้องจุลทรรศน์ พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

1.3.9 อุปกรณ์อื่นๆ เช่น ตะเกียงแอลกอฮอล์ เข็มเขี่ย และใบมีดโกน เป็นต้น

1.4 สารเคมีในการเตรียมเนื้อเยื่อพืช เพื่อการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา (ภูวดล, 2528)

1.4.1 น้ำยาสำหรับฆ่าและรักษาสภาพเซล (killing and fixing solution) คือ น้ำยา FAA (formalin-aceto-alcohol) ซึ่งประกอบด้วยสารเคมีในอัตราส่วนต่อไปนี้

ethyl alcohol	50	มล
glacial acetic acid	5	มล
formalin	10	มล
น้ำกลั่น	35	มล

1.4.2 น้ำยาสำหรับดึงน้ำออกจากเซล (dehydrating solution)

น้ำยามีส่วนผสมของ ethyl alcohol และ tertiary butyl alcohol (TBA) ในอัตราส่วนต่างกัน ตั้งแต่ระดับ 70 % จนถึง 100 % ของแอลกอฮอล์ ดังแสดงส่วนผสมและอัตราส่วนของสารเคมีไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนผสมและอัตราส่วนของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้สำหรับดึงน้ำออกจากเซล

สารเคมี	อัตราส่วน			
	70%	85%	95%	100%
ethyl alcohol (95%)	50	50	50	-
absolute ethyl alcohol	-	-	-	25
TBA	20	35	50	75
น้ำกลั่น	30	75	-	-

1.4.3 สารตัวกลางที่ใช้สำหรับฝังเนื้อเยื่อเพื่อการตัด (embedding media) ได้แก่ Paraplast

1.4.4 น้ำยายึดเนื้อเยื่อให้ติดบนแผ่นสไลด์ (adhesive) ได้แก่ albumin

1.4.5 น้ำยาทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing reagent) ได้แก่ xylol

1.4.6 สีสังเคราะห์สำหรับย้อมสีเนื้อเยื่อคือ Delafield's hematoxylin ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมดังต่อไปนี้

aluminium sulfate [$Al_2(SO_4)_3 . 15H_2O$]	400	มล
hexatomylin	4	กรัม
95% ethyl alcohol	25	มล
methyl alcohol	100	มล
glycerol	100	มล

1.4.7 สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นสไลด์ ได้แก่ Canada balsam (Merck)

1.5 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาการงอกของละอองเกสร

1.5.1 mineral stock solution

H_3BO_3	0.10	กรัม
$Ca(NO_3)_2 . 4H_2O$	0.30	กรัม
$MgSO_4 . 7H_2O$	0.20	กรัม
KNO_3	0.10	กรัม
ละลายในน้ำ	100	มล

1.5.2 culture solution

mineral stock solution	1	มล
sucrose	0.1 0.2 หรือ 0.5	กรัม
น้ำ	9	มล

2 วิธีการทดลอง

2.1 การขยายพันธุ์จากเมล็ด

การศึกษาในหัวข้อนี้ แบ่งออกเป็นการศึกษาทดลองย่อย 5 การทดลอง คือ ศึกษาการสร้างและการเจริญเติบโตของเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย ความสามารถในการงอกของละอองเกสร การเก็บรักษาละอองเกสร การผสมเกสร และ การเพาะเมล็ดของว่านแสงอาทิตย์ โดยมีวิธีการทดลองดังต่อไปนี้

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

2.1.1 การสร้างและการเจริญเติบโตของเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย

ปลูกหัวว่านแสงอาทิตย์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.01 – 7.00 ซม ในถุงดำ ถุงละ 1 หัว เลี้ยงไว้ภายใต้โรงเรือนพรางแสงเพื่อให้ได้ช่อดอกที่มีดอกย่อยขนาดต่างกัน เก็บตัวอย่างดอกที่มีอายุการเจริญเติบโตแตกต่างกัน ตั้งแต่ระยะที่เริ่มสร้างจนกระทั่งถึงระยะที่ดอกเจริญเติบโตเต็มที่มาศึกษาการสร้างและการเจริญเติบโตของเกสรทั้ง 2 ชนิด การเก็บตัวอย่างดอกอ่อนที่มีขนาดเล็กนั้นเก็บจากช่อดอกซึ่งกำลังมีการเจริญเติบโตภายในหัวในช่วงของการพักตัวของหัว ส่วนดอกที่มีขนาดใหญ่และมีการเจริญเติบโตเต็มที่แล้วนั้นเก็บจากช่อดอกที่มีการเจริญเติบโตเหนือดิน

การศึกษาในหัวข้อนี้เป็นการศึกษาเนื้อเยื่อของดอกที่นำไปตัดตามยาวและตามขวางโดยใช้เทคนิค paraffin embedding ตามวิธีการของ Johansen (1940) โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.1.1.1 เก็บตัวอย่างชิ้นส่วนที่ต้องการศึกษาเนื้อเยื่อใส่ลงในขวดแก้วที่บรรจุน้ำยา FAA

2.1.1.2 ดึงน้ำออกจากเซลของเนื้อเยื่อโดยผ่านเนื้อเยื่อที่ทำการตรึงและรักษาสภาพเซลแล้วนั้นลงในน้ำยาที่ใช้ในการดึงน้ำออกจากเซลตามลำดับ จากน้ำยาระดับที่ 1 ไปจนถึงระดับที่ 5 ของน้ำยาที่กล่าวไว้ในข้อ 1.4.2 จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปผ่าน TBA บริสุทธิ์อีกหนึ่งครั้ง ในแต่ละขั้นตอนใช้เวลา 6-12 ชั่วโมง

2.1.1.3 แทรกพาราฟินให้ซึมเข้าเนื้อเยื่อ โดยนำเนื้อเยื่อไปแช่ลงในส่วนผสมของพาราฟินเหลวและ TBA อัตราส่วน 1:1 แช่ทิ้งไว้ 1 คืน หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อลงแช่ในพาราฟินที่หลอมไว้ในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 56 °ซ นาน 2- 3 วัน

2.1.1.4 ฝังชิ้นส่วนเนื้อเยื่อใน Paraplast ในขณะที่ฝังเนื่อเยื่อ ใช้เข็มเขี่ยหรือใบมีดลนไฟให้ร้อนไล่ฟองอากาศที่อยู่ในพาราฟินออกให้หมด พร้อมทั้งจัดเรียงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อให้อยู่ในระนาบและตำแหน่งที่ต้องการตัด

2.1.1.5 ติดแท่งพาราฟินที่ฝังเนื้อเยื่อแล้วบนแท่งไม้แล้วนำไปตัด โดยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุน ตัดเนื้อเยื่อหนา 13 – 15 ไมครอน

2.1.1.6 ติดแผ่นริบบอนเนื้อเยื่อบนแผ่นสไลด์ โดยใช้ adhesive ขณะที่วางแผ่นสไลด์บนแผ่นให้ความร้อน เมื่อแผ่นริบบอนติดแน่นบนแผ่นสไลด์ดีแล้วจึงนำไปผ่าน xylol เพื่อละลายพาราฟินออกก่อนนำไปย้อมสี

2.1.1.7 ย้อมสีเนื้อเยื่อด้วยสี Delafield's hematoxylin

2.1.1.8 ปิดแผ่นสไลด์หลังจากสีแห้งแล้ว โดยใช้ Cannada blasam เป็นตัวยึดแผ่นสไลด์ถาวร

2.1.1.9 นำเนื้อเยื่อไปศึกษา และ บันทึกภาพใต้กล้องจุลทรรศน์

2.1.2 ความสามารถในการงอกของละอองเกสร

เก็บละอองเกสรที่แก่เต็มที่จากดอกของต้นว่านแสงอาทิตย์ที่เจริญเติบโตจากหัวขนาดเดียวกันกับที่ใช้ใน 2.1 เก็บละอองเกสรจากอับละอองเกสรในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน 4 ช่วงเวลาคือ 7.01 – 8.00 8.01 – 9.00 9.01- 10.00 และ 10.01 – 11.00 นาฬิกา (น) นำเกสรเหล่านั้นมาทดสอบความงอกและบันทึกเปอร์เซนต์การงอกตามวิธีการของอดิศร (2539) โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารเลี้ยงแตกต่างกันคือ 1 2 และ 5 % วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ มี 4ซ้ำในแต่ละกรรมวิธี

2.1.3 การเก็บรักษาละอองเกสร

ศึกษาความเป็นไปได้ของการเก็บรักษาละอองเกสรที่อุณหภูมิห้อง (25°ซ - 28°ซ) และที่อุณหภูมิ 5 °ซ โดยการนำละอองเกสรที่แก่เต็มที่มาเก็บไว้ใน petri dish ปิดฝาและใช้เทปติดให้แน่น นำ petri dish ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิทั้ง 2 ระดับดังกล่าวข้างต้นหลังจากนั้นนำละอองเกสรออกมาทดสอบความงอกและบันทึกความสามารถในการงอกทุกๆ 3 วัน จนกระทั่งเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับศูนย์ วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ มี 6 ซ้ำในแต่ละกรรมวิธี

2.1.4 การผสมเกสร

ปลูกหัวว่านแสงอาทิตย์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7.01 - 8.00 ซม จำนวน 120 หัว ลงในถุงพลาสติกสีดำ เลี้ยงไว้ใต้โรงเรือนพรางแสง เมื่อถึงระยะที่ดอกบานจึงผสมเกสรในช่วงเวลาแตกต่างกัน 4 ช่วง คือ 7.00 - 8.00 น. 8.00 - 9.00 น. 9.00 - 10.00 น. และ 10.00 - 11.00 น. การผสมเกสรทำ 2 แบบคือ ผสมข้ามดอกในช่อดอกเดียวกัน และ ผสมข้ามดอกระหว่างช่อดอก โดยผสมช่วงเวลาละ 15 ต้น วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์

การเตรียมดอกที่ใช้เป็นดอกตัวเมียทำในระยะดอกตูม ทำหมันดอก โดยใช้กรรไกรตัดเกสรตัวผู้ออก หลังจากนั้นคลุมดอกนั้นด้วยถุงกระดาษไขและหนีบด้วยคลิปหนีบกระดาษ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของละอองเกสรจากต้นอื่น ดอกที่ใช้เป็นดอกตัวผู้นั้นใช้ถุงกระดาษไขคลุมเช่นกัน

ผสมเกสรในช่วงระยะเวลาที่ระบุไว้แล้วข้างต้น เก็บละอองเกสรที่แก่จากอับละอองเกสรที่แตกแล้วของดอกตัวผู้ ใช้พู่กันแตะละอองเกสร แต้มลงบนยอดเกสรตัวเมีย ล้างพู่กันด้วยแอลกอฮอล์ทุกครั้งเมื่อเปลี่ยนคู่ผสม

หลังจากการผสมเกสรติดตามการเจริญเติบโตของรังไข่ของดอกที่ได้รับการผสมโดยนำรังไข่ของดอกดังกล่าวมาศึกษาเนื้อเยื่อโดยวิธี parafin embedding ตัดรังไข่ที่มีอายุการเจริญเติบโต

แตกต่างกันตามยาวและตามขวางเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของไข่อ่อนภายในรังไข่ในขณะเดียวกันบันทึกขนาดของรังไข่เมื่อรังไข่ขยายขนาดออกมากพอที่จะบันทึกความแตกต่างได้

บันทึกความสามารถในการติดเมล็ดของว่านแสงอาทิตย์ และบันทึกจำนวนวันนับจากวันที่ผสมเกสร จนกระทั่งเมล็ดแก่

2.1.5 การเพาะเมล็ด

เก็บเมล็ดที่แก่แล้วจากต้นที่ผสมติด ทดลองเพาะเมล็ดในวัสดุเพาะและบันทึกความสามารถในการงอกของเมล็ด

2.2 การขยายพันธุ์จากหัว

การศึกษาในหัวข้อนี้เป็นการศึกษาความสามารถในการขยายพันธุ์ว่านแสงอาทิตย์จากหัว โดยการผ่าหัวที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.01 - 6.00 ซม แบบ bulb cutting และ basal cuttage แล้วนำชิ้นแบ่งเหล่านั้นไปชำในวัสดุเพาะ คือ ทรายและขี้เถ้าแกลบ ในอัตราส่วน 1:1 นำกระบะชำไปวางไว้ใต้โรงเรือนพรางแสงแล้วติดตามและ บันทึกการเกิดหัวย่อย

2.2.1 การผ่าหัวแบบ bulb cutting

ผ่าหัวตามยาวด้วยมีดให้ผ่านจุดศูนย์กลางของหัว แบ่งหัวออกเป็น 4 6 และ 8 ชิ้น นำชิ้นแบ่งเหล่านั้นไปทำชำในวัสดุเพาะชำ

2.2.2 การผ่าหัวแบบ basal cuttage

การผ่าหัวแบบ basal cuttage ทำ 3 วิธี คือ scooping โดยเป็นการนำหัวไปคว้านเอาส่วนฐานหัวออกจนหมด ด้วยมีดคว้าน scoring โดยการบากฐานหัวและให้รอยมีดลึกลงไปให้ผ่าน basal plate สัมผัสส่วนปลายของฐานหัวและบากหัวออกเป็นร่อง 3 ร่องโดยให้มีจุดศูนย์กลางของร่องผ่านกัน และ coring ซึ่งเป็นการเจาะเอาฐานหัวที่บริเวณกลางออกแล้วดึงเนื้อเยื่อของฐานหัวบริเวณนั้นออกโดยให้ปลายยอดติดออกไปด้วย เมื่อทำให้หัวเกิดแผล ตามวิธีการทั้ง 3 วิธี แล้วนำหัวเหล่านั้นไปชำในวัสดุเพาะชำ ตั้งกระบะไว้ภายใต้โรงเรือนพรางแสง ติดตามและบันทึกการเกิดหัวย่อยของหัวที่ทำรอยแผลไว้เหล่านั้น

อุปกรณ์ที่ใช้ผ่าหัวผ่านการทำความสะอาดโดยการแช่แอลกอฮอล์และหัวที่ผ่าแล้วผ่านการแช่ในสารละลาย Benlate เพื่อป้องกันเชื้อรา ก่อนที่จะนำไปชำในวัสดุชำ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบรูณ์ (Complete Randomized Design) มีกรรมวิธี 3 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ

บันทึกข้อมูลของการเกิดหัวย่อยบนรอยแผลของหัวที่ผ่าโดยวิธีทั้ง 3 วิธี โดยบันทึกจำนวนวันตั้งแต่ชำหัวจนกระทั่งมีการแทงต้นอ่อนขึ้นมาเหนือวัสดุชำ เมื่อต้นอ่อนเจริญเติบโตแข็งแรงดีและพร้อมที่จะย้ายปลูกแล้ว จึงขุดขึ้นมาพร้อมกับบันทึกข้อมูลผลผลิตของหัวย่อยในแต่ละกรรมวิธี ในแง่ของจำนวนของหัวย่อยต่อชิ้นแบ่งและต่อหัวเดิม และขนาดและน้ำหนักของหัวย่อย

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University