บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การศึกษาทดลองนี้เป็นการศึกษาการเจริญเติบโตของหงส์เหิน 2 ชนิด คือ *G. winitii* Wright และ *G.rosea* Gagnep. โดยที่ *G.winitii* Wright ปลูกจากหัว(rhizome) โดยใช้หัวที่มีจำนวนรากสะสมอาหารใกล้เคียงกัน และ *G. rosea* Gagnep. ปลูกจากหัวย่อย (bulbil) 3 ขนาด คือขนาด A , B และ C ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางหัวเป็น 0.36 – 0.40 , 0.26 – 0.30 และ 0.21 – 0.25 ซม. ตามลำดับ หัวพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้ได้จากศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

การทดลองแบ่งเป็น 2 การทดลองย่อยดังนี้

1. การทดลองที่ 1 การเจริญเติบโตของ *G. winitii* Wright

1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.1.1 หัวพันธุ์พืชทดลองที่มีรากสะสมอาหารเฉลี่ยหัวละ 7 ราก

1.1.2 ถุงดำขนาด 8 x 12 นิ้ว

1.1.3 วัสดุปลูก ได้แก่ ดิน ขี้เถ้าแกลบ และ ทราย ในอัตราส่วน 2 : 2 : 1

1.1.4 เวอร์เนียคาลิปเปอร์

1.1.5 สลากติดชื่อ

1.1.6 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการตัดชิ้นส่วนพืชเพื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาโดยวิธี paraffin embedding

1.1.6.1 กล้องจุลทรรศน์สองตาแบบสเตอริโอ

1.1.6.2 กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

1.1.6.3 เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุน (rotary microtome) พร้อมมีด

1.1.6.4 ตู้อบที่ปรับอุณหภูมิให้เป็น 56 °ซ

1.1.6.5 แผ่นให้ความร้อน (hot plate)

1.1.6.6 กระจกสไลด์และกระจกปิดสไลด์

1.1.6.7 อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บีกเกอร์ กระบอกตวง จานแก้ว ขวดแก้วใส่น้ำยา ขวดแก้วย้อมสี และขวดสำหรับใส่ชิ้นส่วนพืช

1.1.6.8 เครื่องใช้อื่น ๆ ได้แก่ ตะเกียงแอลกอฮอล์ ไม้ขีดไฟ พู่กัน ปากคีบ หลอดหยด สลากติดชื่อ และกระดาษกาว

1.1.6.9 แท่งไม้ขนาด 1.5 x 1.5 x 1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร (ลบ.ซม) ที่ต้มให้อิ่มตัวในพาราฟิน

1.1.7 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมชิ้นส่วนพืชและสไลด์ถาวร

1.1.7.1 น้ำยาตรึงและรักษาสภาพเซลล์ (killing and fixing solution) ได้แก่ FAA (formalin – acetic acid – alcohol) ซึ่งมีส่วนผสมดังนี้

ethyl alcohol 95 %	50 มิลลิลิตร (มล)
acetic acid	5 มล
formalin	10 มล
น้ำกลั่น	35 มล

1.1.7.2 น้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution) ประกอบด้วย ethyl alcohol 95 % , absolute alcohol , tertiary butyl alcohol (TBA) และน้ำกลั่น โดยใช้ส่วนผสมในอัตราที่แตกต่างกัน 5 ระดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 2 อัตราส่วนของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์

ระดับของน้ำยา	ethyl alcohol 95 % (มล)	absolute alcohol (มล)	TBA (มล)	น้ำกลั่น (มล)
50%	40	-	10	50
70%	50	-	20	30
85%	50	-	35	15
95%	45	-	55	-
100%	-	25	75*	-

* ผสมสี erythrosin

1.1.7.3 สารตัวกลางที่ใช้ในการฝังเนื้อเยื่อ ได้แก่ Paraplast

1.1.7.4 xylene

1.1.7.5 น้ำยายึดเนื้อเยื่อพืชให้ติดแผ่นสไลด์ (adhesive)

เตรียมน้ำยา stock โดยใช้ส่วนผสมของ

ไข่ขาว	1 มล
น้ำกลั่น	49 มล

เมื่อจะใช้นำน้ำยา stock 1 มล มาเติมน้ำกลั่นให้เป็น 50 มล

1.1.7.6 สีย้อม ได้แก่ Dalafield's hematoxylin ซึ่งประกอบด้วย

ammonium aluminium sulphate (อิ่มตัวในน้ำ)	400	มล
สี hematoxylin	4	กรัม
ethyl alcohol 95 %	25	มล
glycerine	100	มล
methyl alcohol	100	มล

1.1.7.7 ตัวกลางสำหรับปิดแผ่นสไลด์ (mounting media) คือ Canada balsam

1.2 วิธีการ

ปลูกหัวพืชทดลอง นำไปเลี้ยงไว้ภายใต้โรงเรือนพรางแสงซึ่งพรางแสงได้ประมาณ 50 % แล้วบันทึกผลการทดลองดังต่อไปนี้

1.2.1 วงจรการเจริญเติบโต

ติดตามช่วงของการเจริญเติบโตของต้นและการเจริญเติบโตของดอก และช่วงเวลาที่ส่วนเหนือดินของต้นเริ่มตายไปจนถึงช่วงพักตัว

1.2.2 การเจริญเติบโตของต้น

บันทึกความสูงของต้น จำนวนใบต่อต้น ขนาดและคุณภาพของช่อดอกที่เจริญเติบโตเต็มที่ และผลผลิตของหัวใหม่ต่อต้น โดยบันทึกจากพืชทดลองจำนวน 100 ต้น

1.2.3 การศึกษาการสร้างและการเจริญเติบโตของดอก

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อปลายยอดของต้นพืชทดลองตั้งแต่ช่วงแรกของการเจริญเติบโตทุกสัปดาห์ สัปดาห์ละ 5 ต้น นำเนื้อเยื่อดังกล่าวไปผ่านกรรมวิธีการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อการศึกษาทางกายวิภาค เพื่อบันทึกช่วงเวลาที่มีการเริ่มกำเนิดช่อดอกและดอกย่อย ตลอดจนติดตามขั้นตอนของการเจริญเติบโตของดอกและช่อดอกจากสไลด์ถาวรของเนื้อเยื่อ ถ่ายภาพเนื้อเยื่อที่ตัด

ตามยาวและตามขวางจากกล้องจุลทรรศน์เพื่อประกอบการแสดงขั้นตอนของการสร้างช่อดอกและดอกย่อย

การเตรียมเนื้อเยื่อทำโดยวิธีการ paraffin embedding ของ Johansen (1940) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1.2.3.1 เก็บตัวอย่างชิ้นส่วนพืชที่ต้องการศึกษาเนื้อเยื่อใส่ลงในขวดแก้วบรรจุน้ำยา FAA เพื่อฆ่าเนื้อเยื่อและตรึงเซลล์ ทิ้งเนื้อเยื่อไว้ในน้ำยาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปผ่านกรรมวิธีต่อไป สำหรับเนื้อเยื่อที่ไม่จมในน้ำยานั้น นำขวดบรรจุเนื้อเยื่อไปใส่ในโถสูญญากาศที่มีเครื่องดูดอากาศเพื่อไล่ฟองอากาสออกจากเนื้อเยื่อ

1.2.3.2 ดึงน้ำออกจากเซลล์ของเนื้อเยื่อโดยผ่านเนื้อเยื่อที่ผ่านการฆ่าและรักษาสภาพเซลล์แล้วนั้นลงในน้ำยาที่ใช้ในการดึงน้ำออกจากเซลล์ตามลำดับของน้ำยาจากน้ำยาระดับที่ 50 % ไปจนถึงระดับที่ 100 % หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อไปผ่าน TBA บริสุทธิ์อีก 1 ครั้ง ในแต่ละขั้นตอนใช้เวลา 6 – 12 ชั่วโมง

1.2.3.4 ฝังชิ้นส่วนเนื้อเยื่อซึ่งมีพาราฟินแทรกซึมเข้าไปจนทั่วถึงแล้วใน Paraplast หลอมเตรียมไว้พร้อมทั้งจัดเรียงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อให้อยู่ในระนาบและตำแหน่งที่ต้องการตัด

1.2.3.5 ติดแท่งพาราฟินที่ฝังเนื้อเยื่อแล้วบนแท่งไม้แล้วนำไปใส่เครื่องตัดเนื้อ เยื่อแบบล้อหมุน ตัดเนื้อเยื่อตามยาวหรือตามขวางให้หนา 15 – 18 ไมครอน

1.2.3.6 ติดแผ่นริบบอนเนื้อเยื่อบนแผ่นสไลด์ โดยใช้ adhesive ยึด วางแผ่นสไลด์บนแผ่นให้ความร้อน เพื่อให้แผ่นริบบอนแห้งและติดแน่นบนแผ่นสไลด์

1.2.3.7 นำแผ่นสไสด์ไปย้อมสี โดยนำแผ่นสไสด์ไปผ่าน xylene เพื่อละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อก่อนแล้วจึงนำไปย้อมสี Dalafield's hematoxylin

1.2.3.8 หลังจากย้อมสี ปิดแผ่นสไลด์ด้วยกระจกปิดสไสด์ โดยใช้ Cannada balsam ยึด

1.2.3.9 นำเนื้อเยื่อไปศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์ พร้อมบันทึกภาพ

2. การทดลองที่ 2 ผลของขนาดหัวย่อยต่อการเจริญเติบโตของ *G. rosea* Gagnep.

2.1 วัสดุอุปกรณ์

2.1.1 หัวย่อย ของพืชทดลองขนาด A , B และ C

2.1.2 ถุงดำขนาด 2.5 x 6 นิ้ว

2.1.3 วัสดุปลูกได้แก่ ดิน ขี้เถ้าแกลบ และทราย ในอัตราส่วน 2 : 2 : 1

2.1.4 เวอร์เนียคาลิปเปอร์

2.1.5 สลากติดชื่อ

2.1.6 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการตัดชิ้นส่วนพืชเพื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา โดยวิธี paraffin embedding เช่นเดียวกับใน 1.1.6

2.1.7 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเนื้อเยื่อพืชและสไลด์ถาวรเช่นเดียวกับใน 1.1.7

2.2 วิธีการ

ปลูกหัวของพืชทดลองแล้วนำไปเลี้ยงไว้ใต้โรงเรือนพรางแสงที่พรางแสงได้ประมาณ 50 % แล้วบันทึกผลการทดลองดังต่อไปนี้

2.2.1 บันทึกการเจริญเติบโตของต้นที่ปลูกจากหัวย่อยทั้ง 3 ขนาด ในลักษณะของความสูงของต้น จำนวนใบต่อต้น การให้ดอกและผลผลิตของหัวใหม่ต่อต้น

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) โดยมีกรรมวิธี 3 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 20 หน่วยการทดลอง

2.2.2 ติดตามการสร้างดอกและการเจริญเติบโตของช่อดอกและดอกย่อยของต้นที่ปลูกจากหัวย่อย 3 ขนาด โดยวิธีการเดียวกันกับใน 1.2.3