บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาครั้งนี้แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 เป็นการศึกษาวงจรการเจริญเติบโตของหงส์เหิน 4 พันธุ์ การทดลองที่ 2 เป็นการศึกษาการเจริญเติบโตจากหัวย่อยของหงส์เหิน 1 พันธุ์ และ การทดลองที่ 3 เป็นการศึกษาการสร้างและการเจริญของเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียของหงส์เหิน 9 พันธุ์ ด้วยสาเหตุที่หงส์เหินทั้ง 9 พันธุ์ที่เป็นพืชทดลองในการศึกษาทดลองครั้งนี้เป็นพันธุ์ที่ยังไม่มีข้อมูลอ้างอิงทางอนุกรมวิธานที่แจ้งชัดในการจำแนกออกเป็นชนิด มีแต่เพียงการเรียกชื่อพันธุ์ตามลักษณะทางสัณฐานของต้นและดอกซึ่งยังไม่ได้เป็นชื่อที่ยอมรับกันในทางวิชาการ ดั้งนั้นในการรายงานผลการศึกษาของการศึกษาทดลองครั้งนี้จึงใช้วิธีการเรียกชื่อพืชทดลองแต่ละพันธุ์ตามรหัสประจำพันธุ์โดยมีการบรรยายถึงลักษณะทางสันฐานของพืชทดลองพร้อมทั้งแสดงภาพถ่ายของช่อดอกประกอบไว้ในการรายงานผลการทดลองในแต่ละการทดลองไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลองมีดังต่อไปนี้

1. การทดลองที่ 1 วงจรการเจริญเติบโต

การทดลองนี้เป็นการศึกษาวงจรการเจริญเติบโตของหงส์เหิน 4 พันธุ์ โดยติดตามการเจริญเติบโตของพืชทดลองตั้งแต่ปลูกจนกระทั่งต้นพืชออกดอกและเข้าสู่ระยะพักตัว

1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.1.1 พืชทดลอง

พืชทดลองคือหงส์เหิน 4 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ GW001 , GW002 , GW003 และ GW004 จากศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่ หัวพันธุ์ที่ใช้ปลูกเพื่อการทดลองเป็นหัวพันธุ์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางหัว 1.3 – 1.5 ซม และแต่ละหัวมีรากสะสมอาหารเฉลี่ย 8 รากต่อหัว ใช้พันธุ์ละ 10 หัว

1.1.2 วัสดุปลูก ได้แก่ ดิน ขี้เถ้าแกลบ และ ทราย อัตราส่วน 2 : 2 : 1

1.1.3 ถุงพลาสติกสีดำขนาด 6 x 8 นิ้ว

1.1.4 โรงเรือนพรางแสงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ (%)

1.1.5 ป้ายชื่อ

1.1.6 ไม้บรรทัดและตลับเมตร

1.2 วิธีการ

ปลูกหัวพืชทดลองทั้ง 4 พันธุ์ ในถุงที่บรรจุวัสดุปลูก แล้วนำไปเลี้ยงไว้ภายใต้โรงเรือนพรางแสง ติดตาม และบันทึกผลการทดลองดังนี้

1.2.1 ติดตามการเจริญเติบโตของพืชทดลองจากระยะที่ต้นเริ่มงอก จนกระทั่งระยะที่หัวใหม่หมดระยะพักตัว

1.2.2 บันทึกการเจริญเติบโตทางใบ ในลักษณะ ความสูงของต้น จำนวนใบต่อต้น และผลผลิตของหัวใหม่ต่อต้นในแง่ของจำนวนหัวต่อต้น จำนวนรากสะสมอาหารต่อหัว และเส้นผ่าศูนย์กลางหัว

1.2.3 บันทึกการเจริญเติบโตในช่วงที่มีการเจริญเติบโตของดอก โดยบันทึกบริเวณที่เกิดการสร้างดอก ช่วงของการเริ่มสร้างดอก การเจริญเติบโตของดอก และผลผลิตของดอกในลักษณะของจำนวนช่อดอกต่อต้น

1.2.4 บันทึกการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของหัวใหม่ตลอดช่วงพักตัว

2. การทดลองที่ 2 การเจริญเติบโตจากหัวย่อย

การทดลองนี้เป็นการศึกษาการเจริญเติบโตของต้นหงส์เหินจากหัวย่อย โดยการติดตามการเจริญเติบโตของต้นพืชทดลองตั้งแต่ปลูกจนกระทั่งต้นเข้าสู่ระยะพักตัว

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1 พืชทดลอง

พืชทดลองคือหงส์เหินพันธุ์ GW001 หัวย่อยที่ใช้ในการทดลองเป็นหัวย่อยชนิด bulbil ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางหัว 0.6 – 0.7 ซม จำนวน 60 หัว

2.1.2 วัสดุเพาะ ได้แก่ ทราย และ ขี้เถ้าแกลบ อัตราส่วน 1: 1

2.1.3 วัสดุปลูก ได้แก่ ดิน ขี้เถ้าแกลบ และ ทราย อัตราส่วน 2 : 2 : 1

2.1.4 ตะกร้าพลาสติกทรงสี่เหลี่ยม

2.1.5 ถุงพลาสติกสีดำขนาด 6 x 8 นิ้ว

2.2 วิธีการ

เพาะหัวย่อยของพืชทดลองในวัสดุเพาะจนกระทั่งงอก และมีใบจริง 2 คู่ใบ แล้วจึงย้ายปลูกในถุงพลาสติกสีดำ นำไปเลี้ยงไว้ภายใต้โรงเรือนพรางแสง เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ติดตามการเจริญเติบโต และบันทึกผลการทดลองเช่นเดียวกับในการทดลองที่ 1

3. การทดลองที่ 3 การสร้างและการเจริญของเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย

การทดลองนี้เป็นการศึกษาการสร้างและการเจริญของเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียของพืชทดลอง 9 พันธุ์ โดยติดตามการสร้างและการเจริญของส่วนประกอบของดอกตั้งแต่ดอกยังมีขนาดเล็กจนกระทั่งถึงระยะดอกบาน

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 พืชทดลอง

พืชทดลองคือหงส์เหินจำนวน 9 พันธุ์ อันได้แก่ พันธุ์ GW001 , GW002 , GW003 , GW004 , GW005 , GW006 , GW007 , GW008 และ GW009

3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการศึกษาเนื้อเยื่อโดยวิธีการ Paraffin embedding technique (Johansen, 1940)

3.1.2.1 เครื่องตัดชิ้นส่วนพืชแบบล้อหมุน (rotary microtome)

3.1.2.2 กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo dissecting microscope และ stereo microscope พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

3.1.2.3 ตู้อบที่ปรับอุณหภูมิเป็น 56 $^{\circ}$ ซ

3.1.2.4 แผ่นให้ความร้อน (hot plate)

3.1.2.5 เครื่องอุ่นสไลด์ที่อุณหภูมิ 40 $^{\circ}$ ซ

3.1.2.6 แท่งไม้สี่เหลี่ยมที่มีขนาด 1.5 x 1.5 x 1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่ต้มให้อิ่มตัวในพาราฟิน

3.1.2.7 กระจกสไลด์ และกระจกปิดสไลด์

3.1.2.8 อุปกรณ์เครื่องแก้วได้แก่ ขวดสำหรับใส่ชิ้นส่วนพืช บีกเกอร์ และ ขวดย้อมสี

3.1.2.9 อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ ตะเกียงแอลกอฮอล์ พู่กันขนอ่อน ปากคีบ และ ป้ายติดกาว

3.1.3 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมชิ้นส่วนพืชและสไลด์ถาวร

3.1.3.1 น้ำยารักษาสภาพเซลล์ (fixative) ได้แก่ FAA (Formalin – Acetic acid – Alcohol) ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสม ดังนี้

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

3.1.3.2 น้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution) ประกอบด้วยส่วนผสมดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนผสมของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์

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

3.1.3.3 สารตัวกลางที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อ (embedding media) ได้แก่ Paraplast

3.1.3.4 น้ำยายึดเนื้อเยื่อพืชให้ติดแผ่นสไลด์ (adhesive)

เตรียมน้ำยาเข้มข้นจากส่วนผสมของ

ไข่ขาว	1 มล
น้ำกลั่น	49 มล

เมื่อจะใช้นำน้ำยาเข้มข้นมาเจือจาง โดยใช้น้ำยาเข้มข้น 1 มล มาเติมกลั่นให้เป็น 50 มล

3.1.3.5 สีย้อมเนื้อเยื่อ ใช้สี Dalafield's hematoxylin ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมดังนี้

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

	methyl alcohol	100 มล
	glycerol	100 มล

3.1.3.6 น้ำยาทำให้เนื้อเยื่อสะอาด (clearing reagent) คือ xylene

3.1.3.7 สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นสไลด์ (mounting media) คือ Canada balsam

3.2 วิธีการ

3.2.1 เก็บดอกของพืชทดลองทั้ง 9 พันธุ์ โดยเก็บดอกที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตแตกต่างกัน ตั้งแต่ดอกที่มีขนาดเล็กมากจนถึงดอกบาน นำดอก อับละอองเกสร และรังไข่แช่ใน FAA ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้วโดยที่ถ้าเป็นดอกขนาดเล็กให้แช่ทั้งดอก ส่วนดอกที่มีขนาดใหญ่ตัดเอามาเฉพาะส่วนของอับละอองเกสรและรังไข่เท่านั้น แล้วนำขวดดังกล่าวไปใส่ในเครื่องดูดอากาศเพื่อไล่ฟองอากาศออกจากเนื้อเยื่อก่อน หลังจากนั้นนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนานอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปผ่านขั้นตอนต่อไป

3.2.2 นำเนื้อเยื่อมาผ่านขั้นตอนของการดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยให้เนื้อเยื่อผ่านน้ำยาจากระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในน้ำยา 50% ไปจนถึงระดับ 100% จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปผ่าน TBA 100% ตามด้วยน้ำยาที่ประกอบด้วย TBA และพาราฟินเหลว อัตราส่วน 1 : 1 แล้วนำเนื้อเยื่อไปผ่านขั้นตอนของการแทรกพาราฟินเข้าไปในเนื้อเยื่อ (infiltration)

3.2.3 ผ่านเนื้อเยื่อลงไปในขวดแก้วที่บรรจุพาราฟิน (Paraplast) ที่หลอมแล้ว นำขวดแก้วไปเก็บไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 56 $^{\circ}$ ซ นานประมาณ 1 สัปดาห์ หรือมากกว่าจนกระทั่งพาราฟินแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อจนเต็มที่

3.2.4 นำเนื้อเยื่อมาฝังในพาราฟิน จัดตำแหน่งของเนื้อเยื่อให้อยู่ในตำแหน่งและระนาบที่ต้องการ

3.2.5 นำแท่งพาราฟินที่ได้ไปตัดแต่งให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ให้ชิ้นส่วนพืชอยู่ตรงกลาง แล้วนำมาติดกับแท่งไม้ จากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุน โดยตัดเนื้อเยื่อตามยาวหรือตามขวางให้หนา 15 – 18 ไมครอน

3.2.6 ติดแผ่นริบบอน (paraffin ribbon) ของเนื้อเยื่อกับแผ่นสไลด์ด้วย adhesive วางแผ่นสไลด์บนเครื่องอุ่นสไลด์ จนแผ่นริบบอนแห้งและติดกับแผ่นสไลด์

3.2.7 นำแผ่นสไลด์ที่ละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อแล้วไปย้อมสี

3.2.8 ปิดแผ่นสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์โดยใช้ Canada balsam ยึด

3.2.9 เมื่อแผ่นสไลด์แห้งสนิท นำแผ่นสไลด์ไปศึกษาเนื้อเยื่อใต้กล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพ

3.2.10 การบันทึกข้อมูลเป็นการบันทึกภาพของเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียของดอกของพืชทดลอง ซึ่งเป็นภาพที่แสดงให้เห็นการเจริญของอวัยวะทั้งสองอย่างตั้งแต่เริ่มแรกจนกระทั่งถึงระยะที่ดอกบานและพร้อมผสม

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University