บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษานี้ แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและกายวิภาควิทยาของเอื้องดินใบหมาก

การทดลองที่ 2 การหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการศึกษาจำนวนโครโมโซมปลายราก

การทดลองที่ 3 การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์โดยใช้สารละลายโคลชิซิน

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและกายวิภาควิทยาของต้นเอื้องดินใบหมาก

การทดลองแบ่งออกเป็น 3 การทดลองย่อย คือ ศึกษาวงจรชีวิตของเอื้องดินใบหมาก ศึกษาลักษณะของต้นที่เกิดจากเมล็ด และศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและกายวิภาควิทยา ซึ่งแต่ละการทดลองมีอุปกรณ์และวิธีการ ดังต่อไปนี้

การทดลองที่ 1.1 วงจรชีวิตของเอื้องดินใบหมาก เริ่มตั้งแต่ระยะการผสมเกสร การถือฝัก ระยะการพัฒนาของเมล็ดให้เกิดเป็นโปรโตคอร์ม การเจริญเติบโตของต้นจนพืชโตเต็มที่สามารถย้ายปลูกได้ และระยะเวลาการออกดอก

1.1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.1.1.1 พืชทดลอง ได้แก่ ต้นเอื้องดินใบหมาก จำนวน 5 ต้น ซึ่งคัดเลือกมาจากต้นที่เก็บรวบรวมและปลูกไว้ในแปลงรวบรวมพันธุ์ ต้นพืชดังกล่าวมีขนาดและระยะของการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน และฝักกล้วยไม้อายุ 27 วัน

1.1.1.2 อุปกรณ์ ได้แก่ ไม้บรรทัด สมุด ดินสอ ป้ายชื่อ กล้องถ่ายรูป เวอร์เนียคาลิเปอร์ (vernier caliper)

1.1.1.3 อุปกรณ์ผสมฝักกล้วยไม้ ได้แก่ ไม้จิ้มฟัน ป้ายชื่อ ดินสอ

1.1.1.4 ใบมีดคัตเตอร์ ขวดรูปชมพู่ขนาด 50 และ 150 มิลลิลิตร และขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1.1.5 เครื่องเขย่า (shaker)

1.1.1.6 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (laminar air-flow cabinet)

1.1.1.7 อุปกรณ์ในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ คือ ด้ามมีดเบอร์ 3 ใบมีดผ่าตัดเบอร์ 10 และ เบอร์ 11 ปากคีบ ตะเกียงแอลกอฮอล์ หลอดทดลองสำหรับใส่แอลกอฮอล์ จานเพาะเชื้อ และแผ่นพลาสติกปลอดเชื้อ

1.1.2 สารเคมี

การเตรียมสารละลาย เพื่อการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสูตร VW (1949) ดัดแปลง (CMU1 : Phornsawatchai and Apavatjrut, 2008)

1.1.2.1 สารละลายเข้มข้น

1.1.2.1.1 ธาตุอาหารหลัก ตามสูตร CMU1 เตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น โดยมีความเข้มข้นมากกว่าสูตรมาตรฐาน 20 เท่า และเตรียมให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ชนิดและปริมาตรของสาร ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชนิดและปริมาณของสารในสารละลายธาตุอาหารหลักสูตร CMU1

ชนิด	ปริมาณตามสูตรมาตรฐาน (มก/ล)	ปริมาณในสารละลายเข้มข้น 20 เท่า (ก/ล)
KNO_3	525	10.50
$(NH_4)_2SO_4$	500	10.00
KH_2PO_4	250	5.00
$MgSO_4.7H_2O$	250	5.00
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	151	3.02

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1.2.1.2 ธาตุอาหารรองตามสูตร Murashige and Skoog (1962) (MS) โดยใช้ชนิดและปริมาณ ของสาร ดังแสดงในตารางที่ 2 การเตรียมสารละลายธาตุอาหารของสูตรนี้เตรียมโดยให้เป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นของสารมากกว่าสูตรมาตรฐาน 100 เท่า และเตรียมให้มีปริมาณสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร ใช้สารเคมีตามปริมาณ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ชนิดและปริมาณของสารในสารละลายธาตุของสูตร MS

ชนิด	ปริมาณตามสูตรมาตรฐาน (มก/ล)	ปริมาณในสารละลายเข้มข้น 100 เท่า (มก/ล)
$MnSO_4.4H_2O$	22.30	2,230.0
$ZnSO_4.7H_2O$	8.60	860.0
H_3BO_3	6.20	620.0
KI	0.83	83.0
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	25.0
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	2.5
$CoSO_4.5H_2O$	0.025	2.5

1.1.2.1.3 สารละลายเหล็กในรูป FeEDTA ในสูตร MS ประกอบด้วย $FeSO_4.7H_2O$ และ Na_2EDTA ทำให้เป็นสารละลายเข้มข้น รวมให้มีความเข้มข้นเป็น 100 เท่า และให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร โดยชั่งสารแต่ละชนิดมาละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายแต่ละส่วนเป็น 500 มิลลิลิตร แล้วจึงนำมาผสมกันเก็บรักษาไว้ในขวดสีชา เพื่อป้องกันแสง ใช้สารเคมีตามปริมาณ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ชนิดและปริมาณของสารเคมีในสารละลายเหล็กเข้มข้นสูตร MS

ชนิด	ปริมาณตามสูตรมาตรฐาน (มก/ล)	ปริมาณในสารละลายเข้มข้น 100 เท่า (ก/ล)
$FeSO_4 . 7H_2O$	27.8	2.78
Na_2EDTA	37.3	3.73

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1.2.1.4 อินทรีย์สาร ซึ่งประกอบ วิตามินชนิด glycine และ myo-inositol เตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น ที่มีความเข้มข้นของสารเป็น 100 เท่า และเตรียมให้มีปริมาณสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ปริมาณสารละลายเข้มข้นของอินทรีย์สารสูตร MS ใช้สารเคมีตามปริมาณ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ชนิดและปริมาณของสารเคมีในสารละลายอินทรีย์สาร

ชนิด	ปริมาณตามสูตรมาตรฐาน (มก/ล)	ปริมาณในสารละลายเข้มข้น 100 เท่า (มก/ล)
Myo-inositol	100.00	10,000
Glycine	2.00	200
Thiamine.HCl	0.25	25
Pyridoxin.HCl	0.25	25
Nicotinic acid	0.25	25

1.1.2.1.5 วัสดุอื่นๆ ได้แก่ ผงวุ้น น้ำมะพร้าว น้ำตาลซูโครส แผ่นป้าย และวัสดุที่ใช้สำหรับทำความสะอาด และฆ่าเชื้อ ซึ่งได้แก่ สบู่ น้ำยาล้างจาน น้ำกลั่น เอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ คลอร็อกซ์ (active ingredient : NaOCl 5.25 เปอร์เซ็นต์) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และสารลดความตึงผิว (tween 20) จำนวน 2-3 หยด

1.1.3 วิธีการเตรียมอาหาร

เตรียมอาหารเหลวปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ดังขั้นตอนต่อไปนี้

1.1.3.1 เติมน้ำกลั่นในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ประมาณ 500 มิลลิลิตร

1.1.3.2 เติมสารละลายของธาตุอาหารหลักในสูตร CMU1 ที่มีความเข้มข้น 20 เท่า (เตรียมตามตารางที่ 1) ลงไป 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

1.1.3.3 เติมสารละลายของธาตุอาหารของสูตร MS ที่มีความเข้มข้น 100 เท่า (เตรียมตามตารางที่ 2) ลงไป 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

1.1.3.4 เติมสารละลาย FeEDTA ที่มีความเข้มข้น 100 เท่า (เตรียมตามตารางที่ 3) ลงไป 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

1.1.3.5 เติมสารละลายอินทรีย์สารที่มีความเข้มข้น 100 เท่า (เตรียมตามตารางที่ 4) ลงไป 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

1.1.3.6 เติมน้ำมะพร้าวลงไป 150 มิลลิลิตร (15 เปอร์เซ็นต์)

1.1.3.7 น้ำตาลซูโครส 20 กรัม ใช้แท่งแก้วคนให้น้ำตาลละลาย (2 เปอร์เซ็นต์)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1.3.8 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร

1.1.3.9 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้เป็น 5.7

1.1.3.10 ถ้าต้องการเตรียมอาหารแข็งให้ใส่ผงวุ้นลงไป 8 กรัม แล้วนำไปอุ่นในไมโครเวฟ ประมาณ 7 นาที หรือจนกระทั่งเดือด (วุ้นละลายจนหมด)

1.1.3.11 บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร ขวดละ 10 มิลลิลิตร แต่ถ้าบรรจุในขวดแก้วขนาด 8 ออนซ์ ให้ใส่ขวดละ 30 มิลลิลิตร ปิดด้วยพลาสติกทนความร้อน ใช้ยางรัดและปิดทับด้วยกระดาษไขอีกครั้ง รัดด้วยยางรัด นำไปผึ่งในหม้อนึ่ง ความดันไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้จนเย็นก่อนนำไปใช้

1.1.4 วิธีการศึกษาวงจรชีวิตของเอื้องดินใบหมาก

1.1.4.1 นำต้นเอื้องดินใบหมากที่ทำการคัดเลือก มาทำการผสมพันธุ์แบบผสมตัวเอง ซึ่งดอกที่ทำการผสมควรมีอายุการบานอยู่ในช่วงที่เหมาะสม โดยสังเกตดูได้จากแอ่งของเกสรเพศเมียมีน้ำเมือกเหนียวๆอยู่ เกสรเพศผู้มีสีเหลืองอ่อน ไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือดำ ใช้ไม้จิ้มฟันปลายแหลมสะอาดเขี่ยฝาเปิดเกสรเพศผู้ ให้เกสรเพศผู้หลุดออกมาแล้ววางบนเกสรเพศเมียของต้นเดียวกัน ทำป้ายแขวนไว้ที่ก้านดอกย่อย เขียนวันที่ เดือน ปี ที่ทำการผสม บันทึกระยะการถือฝัก

1.1.4.2 นำฝักกล้วยไม้ที่มีอายุฝักหลังผสมประมาณ 27 วัน มาทำความสะอาดด้วยสบู่และล้างน้ำให้สะอาด ตัดก้าน ตัดดอกที่เหี่ยวแห้งบริเวณปลายฝัก และสันฝักออก ทำความสะอาดด้วย แอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นใส่ฝักแช่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีสารฆ่าเชื้อ คือ คลอร็อกซ์ 25 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ tween 20 จำนวน 2-3 หยด นาน 25 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ

นำฝักที่ทำการฟอกฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว วางลงบนจานเพาะเชื้อที่มีแผ่นพลาสติกปลอดเชื้อรองอยู่ ใช้มีดผ่าตัดผ่าฝักกล้วยไม้ออกตามแนวยาว โดยกรีดระหว่างแนวตะเข็บของฝัก ใช้ปากคีบเหล็กคีบฝักให้อยู่เหนือปลายขวดและใช้ปลายมีดเขี่ยเมล็ดลงบนอาหาร ได้ทำการศึกษาย่อยเพื่อเปรียบเทียบการงอกของเมล็ดบนอาหารแข็งและอาหารเหลว โดยใช้อาหารสูตร CMU 1 โดยเมล็ดที่เพาะบนอาหารแข็ง ทำการทดลอง 5 ซ้ำ โดยเพาะ 1 ฝัก/1 ซ้ำ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ สังเกตและบันทึกผลการพัฒนาของเมล็ดจนกระทั่งเกิดเป็นโปรโตคอร์ม และหาเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด ทุกๆสัปดาห์

เมล็ดที่เพาะในอาหารเหลว นำไปวางเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 60 รอบ/นาที ในสภาพที่มีแสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 5 ซ้ำ โดยเพาะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1 ฝัก/1 ซ้ำ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยแต่ละสัปดาห์นำเมล็ดไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์สังเกตและบันทึกผลการพัฒนาของเมล็ดและระยะของเมล็ดที่เกิดเป็นโปรโตคอร์ม และหาเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด

1.1.4.3 นำโปรโตคอร์มที่เจริญเป็นต้นอ่อนมีใบจริง 1-2 ใบ วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร CMU1 วางเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ทำการบันทึกลักษณะของต้นพืช โดยบันทึกช่วงระยะเวลาต่างๆของการเจริญเติบโต ได้แก่ ความสูงต้น ความยาวใบ จำนวนใบ จำนวนราก ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์

1.1.4.4 ทำการย้ายปลูกต้นพืชลงในกระถาง จดบันทึกระยะวันที่แทงช่อดอก และระยะวันที่ดอกแรกเริ่มแย้มบาน

การทดลองที่ 1.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและกายวิภาควิทยา

การทดลองที่ 1.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานของส่วนประกอบของต้นพืช ได้แก่ ราก ลำต้น ใบ และดอก โดยบันทึกข้อมูลดังกล่าวจากต้นพืชทดลอง 10 ต้น ในระยะที่ส่วนต่างๆ ของต้นเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว

1.2.1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.2.1.1.1 พืชทดลอง

คัดเลือกต้นพืชทดลองจากต้นที่เก็บรวบรวมไว้ในแปลงรวบรวมพันธุ์ โดยคัดต้นที่มีขนาดและระยะของการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน

1.2.1.1.2 อุปกรณ์ ได้แก่ มีดผ่าตัด ปากคีบ ไม้บรรทัด สมุด ปากกา ดินสอ กล้องถ่ายรูป

1.2.1.2 วิธีการ

1.2.1.2.1 บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของส่วนประกอบของต้นพืชทดลอง ได้แก่ ราก ลำต้น ใบ ดอก และฝัก ในระยะที่ต้นและดอกเจริญเติบโตเต็มที่ โดยบันทึกลักษณะจากตัวอย่าง 10 ต้น

1.2.1.2.2 บันทึกจำนวนดอกและขนาดของส่วนประกอบของต้น ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.1.2.2.1 **ลำต้น** บันทึกขนาดของหัวแรก ในลักษณะของเส้นผ่าศูนย์กลาง และความยาวของหัว

1.2.1.2.2.2 **ใบ** บันทึกจำนวนใบต่อต้น และวัดขนาดของใบที่ 2 นับจากโคนต้น

1.2.1.2.2.3 **ดอก** บันทึกขนาดของดอก โดยวัดความยาวจากปลายของกลีบเลี้ยงด้านบนถึงปลายกลีบปาก ความกว้างและความยาวของกลีบเลี้ยง กลีบดอก และกลีบปากของดอกที่บานเต็มที่ ความยาวของก้านดอกย่อย ความยาวของเส้าเกสร จำนวนดอกต่อช่อ และระยะเวลาการบานของดอก

1.2.1.2.2.4 **ฝัก** บันทึกลักษณะของฝัก และบันทึกความกว้าง ความยาวของฝัก

การทดลองที่ 1.2.2 การศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยา

ศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยาของราก ลำต้น ใบ และดอก โดยศึกษาจากเนื้อเยื่อที่ตัดตามขวาง และตามยาวของอวัยวะดังกล่าว ตามวิธีการศึกษาเนื้อเยื่อแบบ paraffin embedding ของ Johansen (1940)

1.2.2.1 วัสดุอุปกรณ์

1.2.2.1.1 เครื่องดูดอากาศ และเครื่องตัดชิ้นส่วนพืชแบบล้อหมุน (rotary microtome) พร้อมใบมีด

1.2.2.1.2 กล้องจุลทรรศน์แบบ dissecting microscope และ stereo-microscope พร้อม อุปกรณ์ถ่ายภาพ

1.2.2.1.3 ตู้อบที่ปรับอุณหภูมิเป็น 56 องศาเซลเซียส

1.2.2.1.4 แผ่นให้ความร้อน

1.2.2.1.5 เครื่องอุ่นสไลด์ที่ปรับอุณหภูมิเป็น 40 องศาเซลเซียส

1.2.2.1.6 แท่งไม้สี่เหลี่ยมขนาด 1.5×1.5×1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่ต้มในพาราฟินจนอิ่มตัว

1.2.2.1.7 แผ่นกระจกสไลด์ (slide) และแผ่นกระจกปิดสไลด์ (cover slip)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.2.1.8 อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดใส่ชิ้นส่วนพืช บีกเกอร์ ขวดย้อมสี กระบอกตวงสารเคมี และหลอดหยด

1.2.2.1.9 อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ ตะเกียงแอลกอฮอล์ ป้ายติดกาว พู่กันขนอ่อน มีดผ่าตัด และปากคีบ

1.2.2.2 สารเคมี

1.2.2.2.1 น้ำยารักษาสภาพเซลล์ (fixative) ได้แก่ FAA (formalin-acetic acid alcohol) ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมดังนี้

95% Ethyl alcohol	50	มิลลิลิตร
Gracial acetic acid	5	มิลลิลิตร
Formalin	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	35	มิลลิลิตร

1.2.2.2.2 น้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution) ประกอบด้วยส่วนผสม ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ส่วนผสมของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์

ขั้นตอน	ปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ (%)	95% Ethyl alcohol (มล)	100% Ethyl alcohol (มล)	Tertiary Butyl alcohol (TBA) (มล)	น้ำกลั่น (มล)
1	50	40	-	10	50
2	70	50	-	20	30
3	85	50	-	35	15
4	95	45	-	55	-
5	100	-	25	75	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.2.2.3 สารตัวกลางที่ใช้ฝังตัวเนื้อเยื่อ (embedding media) ได้แก่ paraplast

1.2.2.2.4 น้ำยายึดเนื้อเยื่อพืชให้ติดแผ่นสไลด์ (adhesive) เตรียมน้ำยาเข้มข้นจากส่วนผสมของไข่ขาว 1 ฟอง และน้ำกลั่น 49 มิลลิลิตร เมื่อต้องการใช้จึงนำน้ำยายึดเนื้อเยื่อดังกล่าวนั้นมาเจือจาง โดยน้ำยาเข้มข้น 1 มิลลิลิตร มาเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวมเป็น 50 มิลลิลิตร

1.2.2.2.5 สีย้อมเนื้อเยื่อใช้สี Delafield's hematoxylin ซึ่งประกอบไปด้วย

Aluminium sulfate [$Al_2(SO_4)_3.16H_2O$]	400	มิลลิลิตร
Hematoxylin ($C_{16}H_{14}O_6$)	4	มิลลิลิตร
95% Ethyl alcohol	25	มิลลิลิตร
Methyl alcohol	100	มิลลิลิตร
Glycerol	100	มิลลิลิตร

1.2.2.2.6 น้ำยาทำให้เนื้อเยื่อสะอาด (clearing reagent) คือ xylene

1.2.2.2.7 สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นสไลด์ คือ canada balsam

1.2.2.3 วิธีการ

การเตรียมสไลด์ถาวรของชิ้นส่วนพืชมีวิธีการ ดังนี้

1.2.2.3.1 เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อของโปรโตคอร์ม ราก ลำต้น ใบ และดอก มาแช่ใน FAA ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้ว แล้วนำขวดนั้นไปใส่ในเครื่องดูดอากาศเพื่อไล่ฟองอากาศออกจากเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนานอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปผ่านขั้นตอนต่อไป

1.2.2.3.2 นำเนื้อเยื่อมาผ่านขั้นตอนของการดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยให้ผ่านน้ำยาจากระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในน้ำยา 50% ไปจนถึงระดับ 100% และน้ำยาที่เป็นส่วนผสมของ TBA และพาราฟินเหลวในอัตราส่วน 1:1 เมื่อถึงขั้นตอนนี้แล้วเนื้อเยื่อเหล่านั้นก็พร้อมที่จะรับการซึมแทรกพาราฟิน (infiltration)

1.2.2.3.3 ถ่ายเนื้อเยื่อลงไปในขวดแก้วที่เติมพาราฟินที่หลอดแล้ว นำขวดแก้วไปเก็บไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นานประมาณ 1 สัปดาห์ หรือมากกว่า เพื่อให้พาราฟินแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อได้เต็มที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.2.3.4 นำเนื้อเยื่อมาฝังในพาราฟิน แล้วจัดตำแหน่งของเนื้อเยื่อให้อยู่ในตำแหน่งและระนาบที่ต้องการ เก็บแท่งเนื้อเยื่อไว้ในที่เย็น หรือในตู้เย็น

1.2.2.3.5 เมื่อต้องการตัดเนื้อเยื่อนำแท่งพาราฟินที่เตรียมไว้ ไปตัดแต่งให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า จัดให้มีชิ้นส่วนพืชอยู่ตรงกลาง นำมาติดกับแท่งไม้ จากนั้นนำแท่งไม้นั้นไปบรรจุในช่องของเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุน ตัดเนื้อเยื่อตามยาวหรือตามขวางตามความเหมาะสมให้หนา 13-15 ไมครอน เนื้อเยื่อที่ผ่านการตัดจะอยู่ในลักษณะของแถบเนื้อเยื่อ (paraffin ribbon)

1.2.2.3.6 นำแถบเนื้อเยื่อติดลงบนแผ่นกระจกสไลด์ด้วยน้ำยายึดเนื้อเยื่อพืช วางแผ่น กระจกสไลด์บนเครื่องอุ่นสไลด์จนแถบเนื้อเยื่อแห้ง และติดแน่นกับแผ่นกระจกสไลด์

1.2.2.3.7 นำแผ่นกระจกสไลด์ที่ละลายพาราฟิน ออกจากเนื้อเยื่อแล้วไปย้อมสี

1.2.2.3.8 ปิดแผ่นกระจกสไลด์ ด้วยแผ่นปิดกระจกสไลด์ โดยใช้ canada balsam ยึด

1.2.2.3.9 เมื่อแผ่นกระจกสไลด์แห้งสนิท นำไปศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพเนื้อเยื่อ

การทดลองที่ 2 การศึกษาจำนวนโครโมโซมปลายราก

ศึกษาโครโมโซมจากเนื้อเยื่อปลายรากของพืชทดลองด้วยวิธี Feulgen's squash ที่ดัดแปลงโดยดวงทิพย์ (2539) และประภัสสร (2543)

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1 ปลายรากของพืชทดลอง

2.1.2 ขวดแก้วขนาดเล็กสำหรับเก็บตัวอย่างราก

2.1.3 แผ่นกระจกสไลด์ และแผ่นกระจกปิดสไลด์

2.1.4 เทอร์โมมิเตอร์วัดอุณหภูมิ

2.1.5 อ่างควบคุมอุณหภูมิ

2.1.6 วัสดุอื่นๆ ได้แก่ ปากคีบ เข็มเขี่ย กระบอกตวงสารเคมี น้ำยาเคลือบเล็บ และมีดผ่าตัด

2.1.7 กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope และ photomicroscope

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.8 สารเคมี

2.1.8.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับหยุดวงชีพเซลล์ (pre-treatment) ได้แก่ para-dichlorobenzene (PDB)

2.1.8.2 สารเคมีที่ใช้เตรียมน้ำยาในการรักษาสภาพเซลล์ (fixative) คือ 95% Ethyl alcohol และ Glacial acetic acid ในอัตราส่วน 3:1

2.1.8.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับย่อยแยกเซลล์ (hydrolytic solution) คือ กรดไฮโดรคลอริค (HCl) เข้มข้น 1 นอร์มอล (N)

2.1.8.4 สีที่ใช้ย้อมโครโมโซม คือ carbol fuchsin

2.2 วิธีการ

2.2.1 เตรียมปลายรากโดยเลือกรากที่งอกใหม่ และมีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ตัดมาเฉพาะส่วนปลายเพียง 1-2 มิลลิเมตร เก็บตัวอย่างปลายรากในช่วงเวลา 7.00-8.00, 8.00-9.00 และ 9.00-10.00 น.

2.2.2 หยุดวงชีพเซลล์โดย แช่ปลายรากในสารละลาย PDB เป็นเวลา 2, 4, 6, 8 และ 10 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส

2.2.3 นำปลายรากออกมาจากสารละลาย PDB ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น แล้วจึงนำไปแช่น้ำยารักษาสภาพเซลล์นาน 5 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเซลล์ จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น

2.2.4 ย่อยแยกเซลล์โดยการแช่รากใน HCl เข้มข้น 1 นอร์มอล นาน 4 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น

2.2.5 ย้อมเนื้อเยื่อปลายรากใน carbol fuchsin แช่ไว้นาน 30 นาที, 1 และ 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นคีบเนื้อเยื่อวางบนแผ่นกระจกสไลด์แล้วจึงใช้มีดผ่าตัด ตัดเฉพาะส่วนปลายรากให้ยาว 1 มิลลิเมตร เขี่ยส่วนเกินทิ้งไป หยดสี 1 หยด ตรงบริเวณปลายราก ใช้เข็มเขี่ยเคาะเนื้อเยื่อเบาๆ เพื่อให้เซลล์กระจาย คีบเนื้อเยื่อส่วนเกินทิ้งไป แล้วปิดแผ่นกระจกสไลด์บนบริเวณที่มีเนื้อเยื่อ วางกระดาษซับบนแผ่นกระจกสไลด์ เพื่อซับสีที่มากเกินไปออก กดนิ้วหัวแม่มือลงไปเพื่อให้เซลล์กระจาย และไล่ฟองอากาศออกให้หมด

2.2.6 นำแผ่นกระจกสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมตาเฟสและมีการกระจายตัวของโครโมโซมดี เมื่อได้เซลล์ที่ต้องการแล้ว กดแผ่นกระจกปิดสไลด์เบาๆ เพื่อให้เซลล์แบน และอยู่ในระนาบเดียวกัน ใช้น้ำยาเคลือบเล็บทาบริเวณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขอบแผ่นปิดกระจกสไลด์เพื่อป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อแห้ง นำแผ่นกระจกสไลด์ไปตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อนับจำนวนโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วบันทึกภาพตามความจำเป็น

การทดลองที่ 3 การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์โดยใช้สารละลายโคลชิซิน

การทดลองนี้เป็นการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของเอื้องดินในหมาก โดยการเพาะเมล็ดให้เป็นโปรโตคอร์ม แล้วนำโปรโตคอร์มที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร CMU 1 ร่วมกับสารละลายโคลชิซิน

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (laminar air-flow cabinet)

3.1.2 ชั้นสำหรับวางขวดเพาะเลี้ยง

3.1.3 เครื่องชั่งละเอียด

3.1.4 เครื่องเขย่า

3.1.5 เครื่องวัดความเป็นกรด/ด่าง

3.1.6 หม้อนึ่งความดันไอ

3.1.7 ขวดรูปชมพู่ ขนาดขนาด 25, 50 และ 125 มิลลิลิตร

3.1.8 ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.1.9 ปิเปตต์ หลอดหยด บีกเกอร์ และ กระบอกตวงขนาด 10, 50 และ 100 มิลลิลิตร

3.1.10 แผ่นกรอง (Millpore filler) ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร และ ถุงมือ

3.1.11 หลอดแก้ว จานเพาะเชื้อ ช้อนตักสาร ขวดใส่สารละลายเข้มข้น และกระดาษอลูมิเนียมฟอยล์

3.1.12 อุปกรณ์ที่ใช้ในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ คือ ด้ามมีดผ่าตัด เบอร์ 3 ใบมีดผ่าตัดเบอร์ 10 และ 11 ปากคีบ ตะเกียงแอลกอฮอล์ แผ่นพลาสติกขนาด 70×90 มิลลิเมตร หลอดทดลอง และช้อนตักโปรโตคอร์ม

3.1.13 เตาไมโครเวฟ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 สารเคมี วัสดุ และวิธีการ

3.2.1 อาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงสูตร CMU 1 (ตามสูตรอาหาร CMU 1 ในการทดลองที่ 1)

3.2.2 สบู่ น้ำกลั่น แอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ คลอร็อกซ์เข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ และ tween 20 จำนวน 2-3 หยด

3.2.3 เตรียมสารละลายเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) นำมากรองฆ่าเชื้อโดยใช้แผ่นกรองขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร

3.3 วิธีการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์โดยใช้สารละลายโคลชิซิน

3.3.1 การเตรียมโปรโตคอร์ม โดยนำเมล็ดจากฝักกล้วยไม้เอื้องดินใบหมากที่มีอายุ 27 วัน มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร CMU 1 ให้เป็นโปรโตคอร์มที่มีขนาด 2-3 มิลลิเมตร

3.3.2 การเตรียมอาหาร โดยใช้ขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 50 มิลลิลิตร บรรจุอาหารเหลวสูตร CMU 1 ร่วมกับสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.000, 0.005, 0.010, 0.025 และ 0.050 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

3.3.3 นำโปรโตคอร์มมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร CMU 1 ร่วมกับสารละลายโคลชิซิน จากนั้นปิดฝาขวดด้วยแผ่นพลาสติกใส รัดยางให้แน่น และหุ้มด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ให้มิดชิดป้องกันไม่ให้ถูกแสง วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 60 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน

3.3.4 เมื่อครบ 5 วัน ทำการเปลี่ยนย้ายโปรโตคอร์มลงในอาหารใหม่ที่ไม่เติมสารละลายโคลชิซิน โดยใช้ช้อนตักโปรโตคอร์มใส่ลงในขวดน้ำกลั่นเพื่อล้างให้สะอาด จากนั้นวางเลี้ยงโปรโตคอร์มบนอาหารแข็งสูตร CMU 1 ปิดปากขวดด้วยแผ่นพลาสติกใส รัดยางให้แน่น วางเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส

3.3.5 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มีทั้งหมด 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 8 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ชิ้น บันทึกผลการทดลอง ได้แก่ อัตราการอยู่รอดของโปรโตคอร์ม ทำการวัดความสูงของต้น จำนวนใบ จำนวนราก ความยาวราก เป็นจำนวน 5 ต้นในแต่ละซ้ำ ทุกๆสัปดาห์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ แล้วย้ายปลูกในโรงเรือน จากนั้นนำปลายรากมาตรวจนับจำนวนโครโมโซม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved