บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

1. ท่อเหล็กขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 cm. ยาว 75cm. เจาะรูที่ปลาย จำนวน 24 แท่ง
2. เชือกไนลอนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 cm. ยาว 26 M. จำนวน 6 เส้น
3. แผงอัดพรรณไม้
4. ชุดไฟส่องสว่างพร้อมแบตเตอรี
5. เข็มเขี่ย คีมคีบ
6. เครื่องแก้วต่างๆ
7. กระดาษการ์ดหนา 300 แกรม ขนาด 30 x 42 cm.
8. พู่กันเบอร์ 1
9. จานเพาะเชื้อ
10. กระดาษกรองเบอร์ 6
11. หลอดหยด
12. แผ่นไลด์
13. ขวดแก้วขนาดเล็กพร้อมฝาปิด
14. กระติกน้ำแข็งขนาดเล็ก
15. กรรไกร เสียม
16. ถาดพลาสติก
17. กระดาษทิชชู
18. กระดาษลูกฟูก กระดาษหนังสือพิมพ์ กาวเลเทกซ์ยี่ห้อTOA
19. Stub (แผ่นวางตัวอย่างของ SEM).
20. เทปกาวสองหน้า
21. ถุงกระดาษ ขนาด 13x20 cm.
22. Grid (แผ่นวางตัวอย่างของ TEM)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 เครื่องมือ

1. กล้องถ่ายภาพดิจิตรอน ยี่ห้อ SONY รุ่น DSC-W 5
2. กล้องจุลทรรศน์สเตริโอ (SM)
3. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (LM)
4. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-5910LV
5. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ยี่ห้อ JEOL รุ่น JEM-2010
6. เครื่องทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤต (CPD) Modle Hcp-2
7. เครื่องฉาบผิวตัวอย่างด้วยโลหะ (Sputter ion) Model Spi-MODULE
8. เครื่องตัดเนื้อเยื่ออย่างละเอียด (Ultramicrotome) Model LKS
9. เครื่องปรับสุญญากาศ (Vacuum evaporrator) Model JEOL – 420
10. เครื่องเหวี่ยง (Centrifuge) Model RS-20
11. เครื่องชั่ง Triple Beam Balance Model 700
12. ตู้อบพรรณไม้

3.3 สารเคมี

1. agar
2. aniline
3. dimethyl amino ethanal
4. distil water
5. dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4.H_2O$)
6. athyl alcohol
7. glutaral dehyde
8. lead acetate
9. lead nitrate
10. mono basic sodium phosphate ($NaH_2PO_4.H_2O$)
11. n- butanal
12. n-butanal glycidyl ether (Qy-1)
13. nonenyl succinic anhydride
14. osmium tetraoxide
15. phthalic acid

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

16. potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$)
17. resin
18. silica gel
19. sodium chlolide
20. sodium hydroxide
21. sodium citrate
22. uranyl
23. vinyl cyclohexene dioxide (ERL 4506)
24. vaslin
25. ทอง (Au)
26. พลาเดียม (Pd)
27. $HgCl_2$

3.4 พืชทดลอง

พันธุ์หญ้าที่เกิดขึ้นในบริเวณมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.5 วิธีการวิจัย

การทดลองที่ 1 สำรวจชนิดและช่วงเวลาที่ออกดอกของพันธุ์ไม้วงศ์หญ้าในมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

1. สุ่มเก็บตัวอย่างพันธุ์ไม้วงศ์หญ้าโดยการวางแปลงเก็บตัวอย่างขนาด 5 x 5 เมตร จำนวน 6 แปลง ตามสภาพถิ่นที่อยู่อาศัย (habitet) ดังนี้

1.1 ตามสภาพแสงแดดที่ได้รับ

1.1.1.พื้นที่ที่ได้รับแสงแดดโดยตรงตลอดทั้งวัน

1.1.2.พื้นที่ที่ได้รับแสงแดดโดยตรงบางช่วงของวัน

1.1.3. พื้นที่ที่ไม่ได้รับแสงแดดโดยตรงเลยตลอดทั้งวัน

1.2. ตามปริมาณน้ำในดิน

1.2.1. พื้นที่ดินมีความชุ่มชื้นเกือบตลอดทั้งปี

1.2.2. พื้นที่ที่ดินมีสภาพปกติทั่วไป

1.2.3 พื้นที่ที่ดินค่อนข้างแห้งแล้ง

2. เก็บตัวอย่างหญ้าจากแต่ละแปลงที่ออกดอกในแต่ละเดือน เดือนละครั้งเป็นเวลาหนึ่งปี ถ่ายภาพพร้อมกับบันทึกวัน เดือน ปี และแปลงที่พบหญ้าชนิดนั้นๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. นำตัวอย่างที่เก็บได้ทำเป็นตัวอย่างแห้งพร้อมกับตรวจสอบหาชื่อวิทยาศาสตร์โดยใช้รูปวิธาน (key) จากหนังสือ Flora of Java (Backer, 1968) และเทียบเคียงกับตัวอย่างจากหอพรรณไม้ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ศึกษารายละเอียดของพันธุ์หญ้าที่เก็บได้กับคำบรรยายลักษณะจากคู่มือและตำราหลายๆเล่มประกอบกันตลอดจนสอบถามจากผู้รู้

การทดลองที่ 2 สำรวจช่วงเวลาที่อับเรณูของหญ้าแตก

1. เริ่มสำรวจตั้งแต่เวลา 05.00 น โดยตัดช่อดอกของหญ้าที่กำลังชูช่อและดอกกำลังเริ่มบาน

2. นำช่อดอกดังกล่าวใส่ในซองกระดาษขนาด 13x20 cm. บันทึกชื่อหญ้า เวลา วัน เดือน ปีที่เก็บตัวอย่าง แล้วรีบนำกลับมาตรวจสอบที่ห้องปฏิบัติการ

3. ตรวจสอบลักษณะของอับเรณูจากช่อดอกที่เก็บมาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตริโอ โดยดูว่าอับเรณูแตกแล้ว (ภาพ3.7) หรือยังไม่แตก (ภาพ3.8) หากอับเรณูแตกหมดแล้วทุกดอกจะต้องเริ่มเก็บตัวอย่างใหม่ในวันรุ่งขึ้นโดยเริ่มต้นเก็บตัวอย่างให้เร็วกว่าเดิม 30 นาที

4. นำช่อดอกที่อับเรณูยังไม่แตกวางลงบนจานเพาะเชื้อที่แห้ง (ภาพ3.10) แล้วตรวจสอบการแตกของอับเรณูทุกๆ 5 นาที เมื่อพบอับเรณูเริ่มแตก (ภาพ3.9) ให้บันทึกเวลาที่อับเรณูเริ่มแตกจนกระทั่งอับเรณูแตกหมดแล้วทั้งช่อดอก จึงบันทึกเวลาที่อับเรณูแตกหมดแล้ว

5. เขย่าช่อดอกของหญ้าเบาๆเพื่อให้เรณูตกลงบนจานเพาะเชื้อแล้วนำช่อดอกทิ้งจะได้เรณูอยู่บนจานเพาะเชื้อ (ภาพ3.11) เพื่อทำการศึกษาต่อไป

การทดลองที่ 3 ศึกษาสัณฐานวิทยาของเรณูหญ้าภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง(LM)

1. ใช้พู่กันเขี่ยเรณูที่เพิ่งจะหลุดออกจากอับเรณู (จากการทดลองที่2 ข้อ 5) ลงบนสไลด์

2. หยดน้ำลงบนสไลด์ที่มีเรณูอยู่โดยไม่ต้องปิด cover slide

3. ศึกษารูปร่าง และลักษณะของช่องเปิด พร้อมกับวัดขนาดของเรณูด้วยไมโครมิเตอร์โดยเฉลี่ยจากเรณูจำนวน 15 เม็ด บันทึกข้อมูลที่ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 4 ศึกษาสัณฐานวิทยาของเรณูหญ้าภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

1. ทำการตรึงตัวอย่าง (fixative) เพื่อให้โครงสร้างของผนังเรณูอยู่ตัวและคงทนโดยใช้พู่กันเขี่ยเรณูที่เพิ่งหลุดออกมาจากอับเรณู (จากการทดลองที่ 2 ข้อ 5) ลงในขวดขนาดเล็กที่มีน้ำยา 2.5% guteral dehyde แล้วนำเรณูที่ละลายในน้ำยาเก็บไว้ในตู้เย็น 1 คืน

2. ค่อยๆริน 2.5% guteral dehyde ออกจากขวดโดยให้เรณูซึ่งตกตะกอนอยู่ที่ก้นขวดหลุดออกน้อยที่สุด เติม0.1 M phosphate buffer ลงไป เก็บไว้ในตู้เย็น 1 ชั่วโมง

3. ดูด 0.1 M phosphate buffer ออกทิ้งแล้วเติม 1 % osmium tetraoxide ลงแทนแล้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิปกติในตู้ดูดควัน 1 ชั่วโมง

4. ทำการกำจัดน้ำออก (dehydration) โดยนำเรณูมาแช่ใน0.1 M phosphate buffer เพื่อล้างเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงแช่เรณูใน ethyl alcohol ตามลำดับขั้นตอนดังนี้

35%	ethyl alcohol	15-20 นาที
70%	ethyl alcohol	15-20 นาที
95%	ethyl alcohol	15-20 นาที(2 ครั้ง)
100%	ethyl alcohol	15-20 นาที(2 ครั้ง)

5. ทำการติดตัวอย่าง (mounting) โดยเทเรณูที่ผ่านการกำจัดน้ำออกแล้วซึ่งอยู่ในขวดขนาดเล็กลงบนกระดาษกรอง ปล่อยทิ้งไว้ให้ alcohol ระเหยไปจนหมด แล้วใช้พู่กันป้ายเรณูไปเคาะลงบนแท่นวางตัวอย่าง (stub) ซึ่งมีเทปกาวสองหน้าติดอยู่ที่ผิวหน้าด้านบน

6. ทำการฉาบผิวตัวอย่างด้วยโลหะหนัก (meltal coating) นำแทนวางตัวอย่างที่มีเรณูอยู่ไปฉาบผิวด้วยโลหะหนัก เป็นเวลา 60 วินาที โลหะหนักที่ใช้ในการฉาบผิว หรือให้กระจายโมเลกุลไปจับบนผิวตัวอย่างต้องเป็นโลหะหนักซึ่งมีโมเลกุลขนาดเล็ก ได้แก่ ทอง(Au) และพลาเดี่ยม (Pd) ผสมกันในอัตรา 2:3 (w/w)

7. นำ stub ของเรณูที่ผ่านการฉาบผิวตัวอย่างด้วยโลหะหนักแล้ว ไปวางในช่องวางตัวอย่าง(specimen chamber) ซึ่งอยู่ติดกับฐานที่เรียกว่า gonimeter stage อยู่ภายในช่องสุญญากาศ gonimeter stage จะมีเครื่องบังคับให้หมุนหรือเอียงได้ตามต้องการ เพื่อเปลี่ยนทิศทางของภาพที่เกิดบนจอCRT หลังจากนำเข้าที่แล้วก็ทำการศึกษาภาพและรายละเอียดต่างๆ โดยใช้แผงควบคุมทำการศึกษาภาพร่างลักษณะ รายละเอียดของพื้นผิว ขนาดและรายละเอียดของช่องเปิด บันทึกภาพที่ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 5 ศึกษาสัณฐานวิทยาของเรญูหญ้าภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

1. ทำการตรึงตัวอย่าง (fixative) เพื่อให้โครงสร้างของผนังเรญูอยู่ตัวและคงทนโดยใช้พู่กันเขี่ยเรญูที่เพิ่งหลุดออกมาจากอับเรญู (จากการทดลองที่ 2 ข้อ 5) ลงในขวดขนาดเล็กที่มีน้ำยา 2.5% guteral dehyde แล้วนำเรญูที่ละลายในน้ำยาเก็บไว้ในตู้เย็น 1 คืน

2. ค่อยๆริน 2.5% guteral dehyde ออกจากขวดโดยให้เรญูซึ่งตกตะกอนอยู่ที่ก้นขวดหลุดออกน้อยที่สุด เติม0.1 M phosphate buffer ลงไป เก็บไว้ในตู้เย็น 1 ชั่วโมง

3. ดูด 0.1 M phosphate buffer ออกทิ้งแล้วเติม 1 % osmium tetraoxide ลงแทนแล้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิปกติในตู้ดูดควัน 1 ชั่วโมง

4. ทำการกำจัดน้ำออก (dehydration) โดยนำเรญูมาแช่ใน0.1 M phosphate buffer เพื่อล้างเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงแช่เรญูใน ethyl alcohol ตามลำดับขั้นตอนดังนี้

35%	ethyl alcohol	15-20 นาที
70%	ethyl alcohol	15-20 นาที
95%	ethyl alcohol	15-20 นาที(2 ครั้ง)
100%	ethyl alcohol	15-20 นาที(2 ครั้ง)

5. ทำการฝังตัวอย่างในวุ้นเนื่องจาก ขั้นตอนการเตรียมเพื่อศึกษา ด้วย TEM จะต้องนำเรญูผ่านสารที่มีความหนืดหลายครั้งประกอบกับเรญูมีขนาดเล็กจะมีความลำบากในการแยกเอาเรญูออกมา จึงใช้วิธีการฝังเรญูเข้าไปในวุ้นเสียก่อน โดยใช้วุ้นต้มสุก แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อให้มีความหนา 1 mm. รอให้วุ้นเกือบจะแข็งตัวแล้วใช้พู่กันเขี่ยเรญูลงไปในวุ้น เมื่อวุ้นแข็งตัวแล้วใช้คัดเตอร์ตัดวุ้นที่มีเรญูอยู่ให้เป็นแผ่นเล็กๆ กว้างประมาณ 2 mm. ยาว 5 mm. เพื่อนำไปผ่านขั้นตอนต่อไป

6. ทำการฝังตัวอย่าง (embedding) โดยนำเรญูฝังเข้าไปใน spur' resin ซึ่งมีลำดับขั้นตอนดังนี้

แช่ตัวอย่างใน	100% ethyl alcohol + n- butyl glycidyl ether (Qy-1)	อัตราส่วน 1:1	15-30 นาที
แช่ตัวอย่างใน	100% ethyl alcohol + n- butyl glycidyl ether (Qy-1)	อัตราส่วน 1:2	15-30 นาที
แช่ตัวอย่างใน	n- butyl glycidyl ether (Qy-1)		15-30 นาที
แช่ตัวอย่างใน	spur' resin + n- butyl glycidyl ether (Qy-1)	อัตราส่วน 1:1	1.30 ชั่วโมง
แช่ตัวอย่างใน	spur' resin + n- butyl glycidyl ether (Qy-1)	อัตราส่วน 1:2	1.30 ชั่วโมง
แช่ตัวอย่างใน	spur' resin ครั้งละ		1 ชั่วโมง (2 ครั้ง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนวุ้นที่มีเรณูอยู่ไปฝังใน spur' resin ซึ่งเตรียมไว้ในช่องเตรียมในช่องตัวอย่าง ช่องตัวอย่างนี้จะอยู่บนแผ่นยางที่มีจำนวนหลายช่องแต่ละช่องกว้าง 0.5 cm. ยาว 1 cm. ลึก 0.3 cm. การฝังตัวอย่างต้องพยายามให้วุ้นที่มีเรณูฝังอยู่นั้นให้อยู่ในระดับกลางของ spur' resin โดยการใช้เข็มเขี่ยเชื้อกดเบาๆ จากนั้นนำแผ่นยางที่บรรจุตัวอย่างลงไปร้อยแล้วไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง

7. ทำการตัดตัวอย่าง (cutting) โดยนำ spur'resin ที่มีเรณูฝังอยู่และผ่านการอบจนแข็งตัวแล้วไปตัดด้วยเครื่องตัวเนื้อเยื่ออย่างละเอียด (ultramicrotome) การตัดจะต้องบางโดยหนาไม่เกิน 60 nm.การที่จะรู้ว่าชิ้นส่วนที่ตัดหนาหรือบางนั้น สังเกตได้จากสีของชิ้นส่วน โดยใช้กล้องสเตริโอของ ultramicrotome ถ้าชิ้นส่วนมีทองแสดงว่าหนาไม่เกิน 60 nm แต่ถ้าหนาเกิน 60 nm ชิ้นส่วนจะมีสีเงิน การตัดนี้เป็นการสุ่มตัด spur' resin ซึ่งมีเรณูอยู่ ultramicrotome จะทำงานโดยอัตโนมัติ ซึ่งชิ้นส่วนที่ได้จะมีทั้งหนาและบาง แผ่นชิ้นส่วนจะตกไปลอยเหนือน้ำในช่องเก็บตัวอย่าง(trough) จากนั้นใช้ตะแกรงแผ่นเล็กๆทำด้วยทองแดงเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 mm เรียกว่า grid ไปตักชิ้นส่วนที่ตัดได้โดยใช้เข็มเขี่ยเล็กๆ(นิยมเอาขนตาของขน) เขี่ยเอาชิ้นส่วนเข้าไปใน grid

8. ทำการย้อมตัวอย่าง (stainning) การย้อมตัวอย่างเป็นการทำให้โมเลกุลของ uranyl และตะกั่วแทรกซึมเข้าไปฉาบเนื้อเยื่อของตัวอย่างเพื่อไม่เกิดการฉีกขาดเมื่อลำแสงอิเล็กตรอนกระทบหรือผ่านตัวอย่าง การย้อมตัวอย่างจะทำเป็น 2 ขั้นตอน คือ

ขั้นตอนแรก ย้อมด้วย uranyl acetate. โดยนำ grid ที่มีชิ้นส่วนของตัวอย่างแช่ใน uranyl acetate ซึ่งเตรียมไว้ในจานเพาะเชื้อ ใช้เวลา 20-30 นาที แล้วล้างออกด้วย 50% ethyl alcohol

ขั้นตอนที่สอง ย้อมด้วย.lead citrate. โดยนำ grid ที่ผ่านการย้อมครั้งแรกแช่ใน lead citrate ในจานเพาะเชื้อให้ท่วม ใช้เวลา 5-10 นาที ล้างด้วย0.2 N NaOH และน้ำกลั่นตามลำดับ

9. ทำการศึกษาด้วย TEM โดยนำ grid ที่ผ่านกระบวนการต่างๆ ดังกล่าวมาแล้วเก็บใน desiccater 2-3 ชั่วโมง เพื่อดูดความชื้นออกแล้วนำแผ่น grid ที่มีตัวอย่างติดอยู่ใส่เข้าไปใน specimen chamber ของ TEM แล้วศึกษารายละเอียดบนจอภาพ บันทึกภาพที่ได้ไว้ทำการศึกษาต่อไป การเกิดภาพใน TEM นั้นแตกต่างจากการเกิดภาพของ SEM เนื่องจากภาพของ TEM เกิดจากความโปร่งใสและความทึบแสงที่มีลำอิเล็กตรอน ผ่านหรือไม่สามารถผ่านตัวอย่างได้ ดังนั้นภาพที่เกิดขึ้นก็คือเงาของตัวอย่างนั้นเอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 3.1 แปลงเก็บตัวอย่างที่ 1 (พื้นที่ที่ได้รับแสงแดดโดยตรงตลอดทั้งวัน)

ภาพ 3.2 แปลงเก็บตัวอย่างที่ 2 (พื้นที่ที่ได้แสงแดดโดยตรงบางช่วงของวัน)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 3.3 แปลงเก็บตัวอย่างที่ 3 (พื้นที่ที่ไม่ได้รับแสงแดดโดยตรงเลย)

ภาพ 3.4 แปลงเก็บตัวอย่างที่4 (พื้นที่ที่ดินชุ่มชื้นเกือบตลอดทั้งปี)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 3.5 แปลงเก็บตัวอย่างที่5 (พืนที่ที่ดินมีสภาพปกติทั่วไป)

ภาพ 3.6 แปลงเก็บตัวอย่างที่ 6 (พื้นที่ที่ดินมีสภาพค่อนข้างแห้งแล้ง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 3.7 ลักษณะอับเรณูของหญ้ารังนกที่แตกและถ่ายเรณูหมดแล้ว

ภาพ 3.8 อับเรณูของหญ้ารังนกจากดอกที่เพิ่งบานรอเวลาที่จะถ่ายเรณู

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 3.9 อับเรณูของหญ้ารังนกที่กำลังเริ่มแตกและกำลังถ่ายเรณู

ภาพ 3.10 การเก็บเรณูของหญ้ารังนก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 3.11 เรณูสดของหญ้ารังนกที่เพิ่งหลุดออกจากอับเรณู

ภาพ 3.12 แท่นติดตัวอย่างสำหรับ SEM (stub)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved