บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการศึกษาวิจัย

วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

1. วัสดุ อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างพันธุ์ไม้ในภาคสนาม
   - 1.1 แผงอัดพรรณไม้ ขนาด 30 X 40 ตารางเซนติเมตร
   - 1.2 กระดาษหนังสือพิมพ์
   - 1.3 กระดาษลูกฟูก
   - 1.4 กรรไกรตัดกิ่งไม้
   - 1.5 เสียม
   - 1.6 ถุงพลาสติก ขนาด 18 X 28 ตารางเซนติเมตร
   - 1.7 ถุงพลาสติกสีดำ ขนาด 30 X 40 เซนติเมตร
   - 1.8 ขวดไวอัลขนาด 1.5 X 9.5 เซนติเมตร
   - 1.9 สมุดบันทึกข้อมูลพรรณไม้ในภาคสนาม
   - 1.10 กล้องถ่ายรูป
   - 1.11 ฟิล์มสไลด์
   - 1.12 ป้าย label
   - 1.13 เครื่องมือวัดความสูงจากระดับน้ำทะเล (altimeter)

2. อุปกรณ์ และสารเคมีสำหรับการเตรียมตัวอย่างพันธุ์ไม้แห้ง
   - 2.1 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ (-40 °C)
   - 2.2 น้ำยาอาบพันธุ์ไม้เพื่อกันแมลงและเชื้อรา
     ส่วนผสม ethyl alcohol 95% 5 ลิตร
     mercuric chloride 75 กรัม
   - 2.3 กระดาษแข็งสีขาว ขนาด 30 X 42 เซนติเมตร
   - 2.4 กระดาษปกขาว ขนาด 30 X 42 เซนติเมตร
   - 2.5 กระดาษปกสีน้ำตาล ขนาด 30 X 42 เซนติเมตร
   - 2.6 กาวผสมระหว่างกาวลาเทกซ์ และกาวน้ำ อัตราส่วน 1 : 1
   - 2.7 แผ่นป้ายบันทึกข้อมูล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.8 เข็ม และด้าย

2.9 ถุงทราย

3. วัสดุ อุปกรณ์สำหรับการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา และการตรวจหาชื่อวิทยาศาสตร์ในห้องปฏิบัติการ

3.1 กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ Nikon SMZ-1

3.2 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง OLYMPUS CH30

3.3 Vernier caliper

3.4 ไม้บรรทัด

3.5 สไลด์และกระจกปิดสไลด์

3.6 เข็มเขี่ย

3.7 ใบมีดโกน

3.8 หลอดหยด

3.9 ปากคีบ

3.10 ตัวอย่างพันธุ์ไม้แห้ง (herbarium specimens) จากในพิพิธภัณฑ์พืช ศาสตราจารย์กสิน สุวตะพันธุ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (BCU)

3.11 เอกสารทางพฤกษอนุกรมวิธานที่เกี่ยวข้อง

4. วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางด้านกายวิภาค

4.1 วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำสไลด์กล้องจุลทรรศน์แบบชั่วคราว

4.1.1 เครื่องตัดเนื้อเยื่อรุ่น Automatic MT-3

4.1.2 ใบมีดโกน

4.1.3 พู่กัน

4.1.4 เข็มเขี่ย

4.1.5 โฟม

4.1.6 สไลด์และกระจกปิดสไลด์

4.1.7 สี safranin O

4.2 วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำสไลด์กล้องจุลทรรศน์แบบถาวร

4.2.1 เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบหมุน (Rotary microtome) และใบมีดแบบ half-ground

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2.2 เครื่องดูดอากาศออกจากเนื้อเยื่อ (vacuum pump)

4.2.3 เครื่องอุ่นสไลด์ (slide warming plate)

4.2.4 เครื่องมือสำหรับฝังเนื้อเยื่อลงในพาราฟินเหลว (paraffin embedding plate)

4.2.5 ตู้หลอมพาราฟิน (paraffin oven)

4.2.6 ขวดแก้วสำหรับย้อมสี (coplin jar)

4.2.7 ขวดแก้วก้นเรียบ

4.2.8 ตะเกียงแอลกอฮอล์

4.2.9 น้ำกลั่น

4.2.10 น้ำยาผนึกตัวอย่างบนสไลด์ (balsam) ชนิด Permount

4.2.11 butyl alcohol, normal

4.2.12 clove oil

4.2.13 ethyl alcohol 50, 70, 95% และ absolute

4.2.14 formalin 5, 40%

4.2.15 glacial acetic acid

4.2.16 glycerin

4.2.17 knox gelatin

4.2.18 methyl cellosolve

4.2.19 paraffin

4.2.20 paraffin oil

4.2.21 xylene

4.2.22 สี eosin

4.2.23 สี fast green

4.2.24 สี safranin O

4.3 วัสดุ อุปกรณ์ที่ใช้ในการบันทึกภาพ

4.3.1 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง OLYMPUS BH-2

4.3.2 กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ OLYMPUS SZX9

4.3.3 อุปกรณ์ชุดถ่ายภาพ OLYMPUS DP11

5. วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาสัณฐานวิทยาของสปอร์

5.1 วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

5.1.1 potassium hydroxide 10%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.1.2 glacial acetic acid

5.1.3 sulphuric acid conc.

5.1.4 acetic acid anhydride

5.1.5 ethyl alcohol 70%, 95% และ absolute

5.1.6 benzene

5.1.7 silicone oil

5.1.8 paraffin

5.1.9 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

5.1.10 หลอดทดลองก้นแหลม (centrifuge tubes) ขนาดจุ 15 มล.

5.1.11 ถ้วยกรอง (sieving crucible)

5.1.12 แท่งแก้วคนสาร

5.1.13 บิกเกอร์ขนาดจุ 100 มล.

5.1.14 หลอดไวอัล (vial) ขนาดเล็กสำหรับเก็บรักษาเรณู

5.1.15 hot plate

5.1.16 warm plate

5.1.17 micrometer

5.1.18 สไลด์ และแผ่นแก้วปิด

5.1.19 ไม้จิ้มฟัน

5.1.20 น้ำกลั่น

5.2 วัสดุ อุปกรณ์ที่ใช้ในการบันทึกภาพ

5.2.1 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง OLYMPUS BH-2

5.2.2 อุปกรณ์ชุดถ่ายภาพ OLYMPUS DP11

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการศึกษาวิจัย

1. การตรวจเอกสาร

ศึกษาเอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาเฟิร์นในสกุล *Thelypteris* ทั้งในประเทศและต่างประเทศ โดยเฉพาะลักษณะทางด้านจุลทรรศน์เปรียบเทียบ ทั้งลักษณะสัณฐานวิทยาและกายวิภาค รวมถึงการศึกษาด้านต่างๆที่เกี่ยวข้อง

2. การศึกษาภาคสนาม

2.1 การกำหนดพื้นที่ในการเก็บตัวอย่าง

ศึกษาข้อมูลหาแหล่งที่มีการพบเฟิร์นสกุล *Thelypteris* จากข้อมูลที่มีปรากฏอยู่ใน Flora of Thailand และกำหนดพื้นที่ในการเก็บตัวอย่าง ดังต่อไปนี้

2.1.1 อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่

2.1.2 อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่

2.1.3 อุทยานแห่งชาติเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่

2.1.4 อุทยานแห่งชาติดอยขุนตาน จังหวัดลำปาง

2.1.5 อุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า จังหวัดพิษณุโลก

2.1.6 อุทยานแห่งชาติไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี

2.1.7 อุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี

2.1.8 อุทยานแห่งชาติน้ำตกพลิ้ว จังหวัดจันทบุรี

2.1.9 อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ จังหวัดนครราชสีมา

2.1.10 วนอุทยานน้ำตกกระเปาะ จังหวัดชุมพร

2.1.11 อุทยานแห่งชาติใต้ร่มเย็น จังหวัดสุราษฎร์ธานี

2.1.12 อุทยานแห่งชาติเขาสก จังหวัดสุราษฎร์ธานี

2.1.13 อุทยานแห่งชาติน้ำตกสี่ขีด จังหวัดนครศรีธรรมราช

2.1.14 อุทยานแห่งชาติเขาหลวง จังหวัดนครศรีธรรมราช

2.1.15 อุทยานแห่งชาติเขานัน จังหวัดนครศรีธรรมราช

2.1.16 อุทยานแห่งชาติเขาน้ำค้าง จังหวัดสงขลา

2.1.17 เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าโตนงาช้าง จังหวัดสงขลา

2.1.18 อุทยานแห่งชาติบางลาง จังหวัดยะลา

2.2 การเก็บตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างเฟิร์นสกุล *Thelypteris* ให้ครอบคลุมจำนวนสกุลที่ Boonkerd & Pollawatn (2000) ได้แยกไว้ทั้ง 14 สกุลๆละ 1-3 ชนิด ในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทยที่กำหนดไว้

3. การศึกษาในห้องปฏิบัติการ

3.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาอย่างละเอียดและตรวจสอบหาชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้อง โดยใช้รูปวิธานจำแนกชนิด จากเอกสารทางพฤกษอนุกรมวิธานต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง

3.2 ศึกษาลักษณะจุลทรรศน์เปรียบเทียบของเฟิร์นในสกุล *Thelypteris* ที่เก็บมาจากพื้นที่ต่างๆ ดังต่อไปนี้

3.2.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโครงสร้างที่ไม่ใช้ในการสืบพันธุ์ โดยศึกษาลักษณะของปากใบ (stoma) ขน (hairs) และสเกล (scales)

3.2.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโครงสร้างที่ใช้ในการสืบพันธุ์ โดยศึกษาลักษณะของกลุ่มอับสปอร์ (sorus) อับสปอร์ (sporangium) และสปอร์ (spore)

3.2.3 ศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของส่วนต่างๆของเฟิร์น ได้แก่ แผ่นใบ (frond) ก้านใบ (stipe) และลำต้น (rhizome) โดยคัดเลือกจากส่วนที่เจริญเต็มที่แล้ว

3.3 การเตรียมชิ้นส่วนพืชเพื่อการศึกษาทางสัณฐานวิทยาของโครงสร้างที่ไม่ใช้ในการสืบพันธุ์ โดยทำเป็นสไลด์กล้องจุลทรรศน์แบบชั่วคราว

3.3.1 ศึกษาลักษณะของปากใบ โดยการนำใบมาลอกเอาเนื้อเยื่อผิวใบทั้งสองด้าน แล้วนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกลักษณะ และถ่ายภาพไว้

3.3.2 ศึกษาลักษณะของขนที่ขึ้นปกคลุมตามส่วนต่างๆ ของพืช โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอและกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง บันทึกลักษณะ และถ่ายภาพไว้

3.3.3 ศึกษาลักษณะของสเกล โดยการลอกสเกลจากส่วนต่างๆ ของพืช แล้วนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอและกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง บันทึกลักษณะ และถ่ายภาพไว้

3.4 การเตรียมชิ้นส่วนพืชเพื่อการศึกษาทางสัณฐานวิทยาของโครงสร้างที่ใช้ในการสืบพันธุ์ โดยทำเป็นสไลด์กล้องจุลทรรศน์แบบชั่วคราวและแบบถาวร

3.4.1 ศึกษาลักษณะของกลุ่มของอับสปอร์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอลอกเยื่อคลุมกลุ่มอับสปอร์แล้วนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง บันทึกลักษณะ และถ่ายภาพไว้

3.4.2 ศึกษาลักษณะของอับสปอร์ โดยการเขี่ยอับสปอร์ให้หลุดออกจากกลุ่มอับสปอร์ แล้วนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง บันทึกลักษณะ และถ่ายภาพไว้

3.4.3 ศึกษาลักษณะสปอร์ โดยผ่านวิธีการเตรียมสปอร์สำหรับศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (LM) ผ่านกรรมวิธีอะซีโตไลซีส ตามวิธีของ Erdtman (1952 อ้างถึงใน กันยา สันทนะโชติ, 2524) และดัดแปลงวิธีการบางขั้นตอน ดังนี้

3.4.3.1 เขี่ยอับสปอร์ลงในบิกเกอร์ เติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 10% ลงไปจนท่วมตัวอย่างแล้วนำไปต้มให้เดือดประมาณ 2 นาที คอยระวังอย่าให้ตัวอย่างแห้ง

3.4.3.2 กรองตัวอย่างด้วยถ้วยกรอง (sieving crucible) นำส่วนของผสมที่กรองได้รินใส่ในหลอดแก้วก้นแหลม นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วประมาณ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้สปอร์ตกตะกอน เทสารละลายทิ้ง

3.4.3.3 นำสปอร์จากข้อ 3.4.3.2 มาล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง เพื่อให้หมดกรด โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงช่วยตกตะกอนสปอร์

3.4.3.4 เติมกรดอะซิติก (glacial acetic acid) ลงในหลอดแก้วประมาณ 10 ml นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงนานประมาณ 1 นาที แล้วเทกรดทิ้ง เพื่อกำจัดน้ำออกจากตัวอย่าง

3.4.3.5 ใส่สารผสมอะซีโตไลซีส (อะซิติกอัลไฮไดรด์ : กรดซัลฟุริก = 9 : 1) แล้วอุ่นในน้ำเดือดนาน 1 นาที จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงนานประมาณ 1 นาที เทสารผสมทิ้ง

3.4.3.6 ล้างสารผสมอะซีโตไลซีสที่หลงเหลืออยู่ด้วยกรดอะซิติก เช่นเดียวกับข้อ 3.4.3.4

3.4.3.7 นำสปอร์ที่ได้อะซีโตไลซีสแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง เช่นเดียวกับข้อ 3.4.3.3 แล้วเทน้ำทิ้ง

3.4.3.8 ดึงน้ำออกจากตัวอย่างโดยใช้เอทิลอัลกอฮอล์ (ethyl alcohol) ที่ความเข้มข้น 70%, 95% และ 100% (absolute) ตามลำดับ โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงช่วยตกตะกอนสปอร์ และในครั้งสุดท้ายหลังจากเติมเอทิลอัลกอฮอล์ 100% แล้ว ให้นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงนานประมาณ 1 นาที แล้วเทเอทิลอัลกอฮอล์ทิ้ง จากนั้นคว่ำหลอดแก้วลงบนกระดาษกรอง เพื่อให้หลอดแห้ง แล้วเติมเบนซิน 2 ml นำไปผ่านกระบวนการคนให้ฟุ้งกระจาย แล้วเทใส่หลอดบรรจุขนาดเล็ก เติมน้ำมันซิลิโคน 4-5 หยด ทิ้งไว้ข้ามคืน เพื่อให้เบนซินระเหย จากนั้นนำสปอร์มาผนึกสไลด์ด้วยพาราฟิน

3.4.3.9 บันทึกลักษณะของสปอร์ผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง จำนวน 10 สปอร์ ต่อ 1 ชนิด โดยบันทึก รูปร่าง ขนาด สมมาตร และวัดความยาวและความกว้างของสปอร์ แล้วบันทึกภาพของลวดลายบนผนังชั้นนอก

3.5 การเตรียมชิ้นส่วนพืชเพื่อการศึกษาทางกายวิภาค โดยทำเป็นสไลด์กล้องจุลทรรศน์แบบถาวร

3.5.1 การเตรียมชิ้นส่วนพืช

3.5.1.1 แผ่นใบ เลือกใบย่อยจากบริเวณกลาง ๆ ของใบประกอบ แล้วตัดแผ่นใบย่อยบริเวณกลางๆ ของแผ่นใบให้ติดเส้นกลางใบ จากการแบ่งแผ่นใบย่อยให้เป็น 3 ส่วน แล้วเลือกส่วนที่อยู่ตรงกลาง โดยตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด กว้าง 0.8-1 ซม. และยาว 1 ซม. จำนวน 10 ชิ้น สำหรับตัดเป็นชิ้นบาง ๆ ตามขวาง

3.5.1.2 โคนก้านใบ ตัดส่วนของก้านใบจากต้นที่เจริญเต็มที่แล้ว นับจากส่วนที่เชื่อมติดกับลำต้นขึ้นไป เป็นท่อนยาวท่อนละ 0.8-1 ซม. จำนวน 3-5 ท่อน สำหรับตัดเป็นชิ้นบางๆ ตามขวาง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5.1.3 ปลายก้านใบ ตัดส่วนของก้านใบจากต้นที่เจริญเต็มที่แล้ว นับจากส่วนที่เชื่อมติดกับแผ่นใบลงมา เป็นท่อนยาวท่อนละ 0.8-1 ซม. จำนวน 3-5 ท่อน สำหรับตัดเป็นชิ้นบางๆ ตามขวาง

3.5.1.4 ลำต้นหรือเหง้า ตัดจากส่วนที่เจริญเต็มที่แล้ว เป็นท่อนยาวท่อนละ 1 ซม. จำนวน 3-5 ท่อน สำหรับตัดเป็นชิ้นบางๆ ตามขวาง

3.5.2 การทำสไลด์กล้องจุลทรรศน์แบบถาวร

นำชิ้นส่วนพืชที่เตรียมไว้ มาทำสไลด์ถาวร โดยการฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน (parffin embedding method) ตามวิธีของ Johansen (1940 อ้างถึงใน มานิต คิดอยู่, 2543) และดัดแปลงวิธีการบางขั้นตอน ดังนี้

3.5.2.1 การฆ่าและคงสภาพเนื้อเยื่อ (killing and fixing of tissue) นำชิ้นส่วนของพืชที่เตรียมไว้มาผ่านกระบวนการรักษาสภาพโดยแช่ในสารละลายที่ทำให้คงสภาพ (fixative) ชนิด formalin-aceto-alcohol (FAA)[1] จากนั้นนำไปผ่านการดูดอากาศออกจากเนื้อเยื่อโดยใช้เครื่องดูดอากาศ (suction pump) และแช่ทิ้งไว้ไม่น้อยกว่า 24 ชั่วโมง

3.5.2.2 การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) โดยแช่ไว้ในสารละลายดึงน้ำ (dehydrant[2]) ที่ประกอบด้วยส่วนผสมของ ethyl alcohol และ butyl alcohol ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 8 ลำดับขั้น เรียงตามลำดับ แต่ละระดับความเข้มข้นแช่นานประมาณ 2 ชั่วโมง

3.5.2.3 การนำพาราฟินเข้าสู่เซลล์และการฝังด้วยพาราฟิน (paraffin infiltration and embedding) นำส่วนของพืชจากสารละลายดึงน้ำหมายเลข 8 มาผ่านกระบวนการแทรกซึมด้วยพาราฟินหลอม โดยการนำชิ้นตัวอย่างแช่ในพาราฟินบริสุทธิ์แล้วนำไปไว้ในตู้หลอมพาราฟินที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 1/2 – 2 ชั่วโมง เพื่อเปลี่ยนพาราฟินแต่ละครั้ง ซึ่งต้อง

---

[1] *FAA ประกอบด้วย formalin 40% 5 มิลลิลิตร glacial acetic acid 5 มิลลิลิตร และ ethyl alcohol 70% 90 มิลลิลิตร*

[2] *Dehydrant ส่วนผสมของ ethyl alcohol และ butyl alcohol ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ในการเตรียม 100 มิลลิลิตร*

สาร	Dehydrant							
น้ำกลั่น	1	2	3	4	5	6	7	8
Ethyl alcohol 95%	50	30	15	5	-	-	-	-
Butyl alcohol,normal	40	50	50	40	25	-	-	-
Ethyl alcohol, absolute	10	20	35	55	75	100	100	50
สี eosin	-	-	-	-	-	เล็กน้อย	-	-

เปลี่ยนประมาณ 5 ครั้ง จนพาราฟินสะอาดแทรกซึมในเนื้อเยื่อ จากนั้นฝังชิ้นส่วนของพืชในพาราฟินบริสุทธิ์แล้วปล่อยให้พาราฟินแข็งตัว

3.5.2.4 การตัดแต่งชิ้นตัวอย่าง (trimming) นำชิ้นส่วนของพืชที่ฝังอยู่ใน paraffin มาทำการตัดแยกเป็นชิ้นเดี่ยวๆ และตัดแต่งให้เป็นรูปลูกเต๋า มีด้านหน้าตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าหรือจัตุรัสตามความเหมาะสม จากนั้นนำตัวอย่างที่ตัดเป็นลูกเต๋าเรียบร้อยแล้วมาติดบนแท่นที่เป็นตัวยึดให้ติดกับเครื่อง โดยใช้พาราฟินหลอมเป็นตัวเชื่อมให้ลูกเต๋าติดกับแท่น

3.5.2.5 การตัดเป็นชิ้นบาง (sectioning) นำตัวอย่างที่ติดบนแท่นยึดแล้วมาตัดเป็นชิ้นบางด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบใช้มือหมุน (rotary microtome) ให้เป็นชิ้นต่อเนื่อง (serial section) และมีความหนาของชิ้นตัวอย่างประมาณ 15-20 ไมครอน

3.5.2.6 การนำส่วนของพืชที่ตัดเป็นชิ้นบาง ๆ แล้วมาติดบนสไลด์ (flattening) โดยใช้น้ำยาติดสไลด์ของฮอพท์[3] (Haupt's adhesive) และสารละลายฟอร์มาลิน (formalin) 3% และทำให้แห้งโดยใช้เครื่องอุ่นสไลด์

3.5.2.7 การย้อมสีและการผนึกชิ้นบางบนสไลด์ (staining and mounting) นำสไลด์มาย้อมด้วยสี safranin O[4] และ สี fast green[5] ตามวิธีของ Johansen (1940) แล้วจึงผนึก (mounting) ด้วย balsam ชนิด Permount แล้วนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกลักษณะและถ่ายภาพไว้

3.6 การเตรียมชิ้นส่วนของพืชเพื่อการศึกษาทางกายวิภาค โดยการทำสไลด์กล้องจุลทรรศน์แบบชั่วคราว

นำชิ้นส่วนลำต้นที่เตรียมไว้ มาตัดให้เป็นชิ้นบาง โดยใช้เครื่อง microtome รุ่น Automatic MT-3 ให้มีความหนาประมาณ 30-40 ไมครอน นำชิ้นบาง ๆ ของลำต้นที่ได้มาย้อมด้วยสี safranin O เจือจาง แล้วนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกลักษณะ และถ่ายภาพไว้

3.7 จัดทำคำบรรยายลักษณะจุลทรรศน์ทั้งลักษณะสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของส่วนต่าง ๆ ของพืชแต่ละชนิด

3.8 เปรียบเทียบลักษณะจุลทรรศน์ทั้งลักษณะสัณฐานวิทยาและกายวิภาคและสรุปผลการศึกษา เพื่อหาแนวทางประกอบการพิจารณาการจัดจำแนก

---

[3] *น้ำยาติดสไลด์ของฮอพท์ ประกอบด้วย knox gelatin 1 กรัม phenol crystal 2 กรัม glycerin 15 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร*

[4] *สี safranin O ประกอบด้วย สี safranin O 4 กรัม methyl cellosolve 200 กรัม ethyl alcohol 95% 100 มิลลิลิตร sodium acetate 4 กรัม และ formalin 8 มิลลิลิตร*

[5] *สี fastgreen ประกอบด้วย methyl cellosolve 1 ส่วน absolute ethyl alcohol 1 ส่วน clove oil 1 ส่วน และ สี fastgreen 0.5%*