

อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย

1. อุปกรณ์

- 1.1 เนื้อเยื่อกล้วยไม้ที่นำมาเลี้ยงเพื่อศึกษาการเจริญและเปลี่ยนแปลงด้วยการบันทึกภาพเป็นระยะนี้ ใช้เนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหวายชนิดหนึ่งคือหวายปอมปาดัวร์ (Dendrobium Pompadour) ซึ่งรองศาสตราจารย์ ดร. ดาวร วัชรภักดิ์ เลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง
- 1.2 หลอดแก้วฝาเกลียวชนิดมีผิวหน้าด้านหนึ่งเรียบขนาด 15 X 150 มม. สำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ที่ถ่ายภาพยนตร์ การที่ใช้หลอดแก้วชนิดนี้แทนหลอดแก้วแบบธรรมดา ก็เพื่อป้องกันการกระจายและการสะท้อนของแสงอันเกิดเนื่องจากความโค้งของหลอดแก้ว
- 1.3 กล้องถ่ายภาพยนตร์ Kodak Special II ขนาด 16 มม. กล้องถ่ายภาพยนตร์แบบนี้มีปุ่มกดถ่ายทีละภาพ (single-frame release) ทำให้สามารถบันทึกภาพเป็นระยะได้โดยอัตโนมัติ ด้วยการใช้แรงที่เกิดจากแม่เหล็กไฟฟ้าบังคับให้ปุ่มกดถ่ายทีละภาพนี้ทำงาน
- 1.4 ฟิล์มถ่ายภาพยนตร์ Kodak Tri-X Panchromatic Negative หมายเลข 7233 และกระดาษอัดรูป
- 1.5 เครื่องถ่ายภาพยนตร์แบบ time - lapse¹ (รูปที่ 1)

¹ ประดิษฐ์ขึ้นโดยศาสตราจารย์ ยรรยง ณ ตะกั่วทุ่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภิญโญ บัณฑิตยารชุน และรองศาสตราจารย์ ดร. ดาวร วัชรภักดิ์ แห่งคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 เครื่องถ่ายภาพยนตร์แบบ time-lapse

- 1.6 นาฬิกาไฟฟ้าที่เดินครบหนึ่งรอบในเวลา 24 ชั่วโมง
- 1.7 หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ Philips TL 20 W/54
- 1.8 กระจกอะลูมิเนียมสำหรับช่วยสะท้อนแสงเพื่อเพิ่มแสงในการถ่ายภาพยนตร์
- 1.9 ขาตั้งสำหรับใช้ยึดหลอดแก้วเพื่อถ่ายภาพยนตร์
- 1.10 อาหารสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ตามสูตรของรองศาสตราจารย์ ดร. ดาวรรักษ์ รัชรักษ์ ซึ่งคัดแปลงมาจากสูตร Knudson B (1922) (ดูภาคผนวก)

2. วิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เครื่องแก้วทุกชนิดก่อนจะนำไปใช้ในการทดลองล้างด้วยกรดกำมะถันที่มีความเข้มข้นประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ แล้วล้างเอากรดออกด้วยน้ำประปาหลายๆ ครั้ง และอันดับสุดท้ายล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 3 ครั้ง

ใช้ปากคีบที่สะอาดชุบแอลกอฮอล์ 75 เปอร์เซ็นต์ แล้วฉีกไฟไหม้แห้ง คีบชิ้นเนื้อเยื่อ Dendrobium Pompadour ที่เลี้ยงไว้ใน flask นำมาวางใน Petri dish ที่กำจัดเชื้อแล้ว ใช้น้ำที่ปลายแหลมที่กำจัดเชื้อด้วยวิธีเดียวกับปากคีบตัดแบ่งก้อนเนื้อเยื่อออกเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดความกว้างด้านละ 5.5 ถึง 7.5 มม. ใช้เข็มที่กำจัดเชื้อเขี่ยชิ้นเนื้อเยื่อที่ตัดแบ่งแล้วออกมาวางบนวุ้นอาหารในหลอดแก้วฝาเกลียวที่มีผิวหน้าด้านหนึ่งเรียบขนาด 15 x 150 มม. แบ่งชิ้นเนื้อเยื่อเหล่านี้ลงเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นสองพวก พวกแรกเลี้ยงบนวุ้นอาหารที่มีน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์กับมี 2,4-D 0.1 ppm พวกที่สองเลี้ยงบนวุ้นอาหารที่มีแต่ 2,4-D 0.1 ppm ไม่มีน้ำมะพร้าวเลย

นำหลอดแก้วที่เลี้ยงเนื้อเยื่อบนวุ้นอาหารทั้งสองสูตรนี้อย่างละหลอด ไปจุกตั้งไว้หน้ากล้องถ่ายภาพยนตร์ โดยใช้เครื่องยึดจากขาตั้งเหล็กยึดหลอดทั้งสองไว้ จัดให้หลอดแก้วอยู่ห่างจากเลนส์ถ่ายภาพหน้ากล้องประมาณ 10 ซม. กล้องถ่ายภาพยนตร์นี้จะถ่ายแบบอัตโนมัติเป็นระยะๆ ด้วยอัตรา 3 ชั่วโมงต่อภาพหรือวันละ 8 ภาพ เนื้อเยื่อที่เลี้ยงบนวุ้นอาหารทั้งสองพวกนี้ นอกจากจะศึกษาการเจริญและเปลี่ยนแปลงโดยการถ่ายภาพยนตร์แบบ time-lapse แล้ว ยังได้นำมาเลี้ยงเปรียบเทียบกันในสภาพเดียวกันกับหลอดที่ถ่ายภาพยนตร์ทั้งสอง โดยจุกวางไว้ในบริเวณเดียวกัน ศึกษาการเจริญและเปลี่ยนแปลงพร้อมทั้งบันทึกผลไว้ด้วย

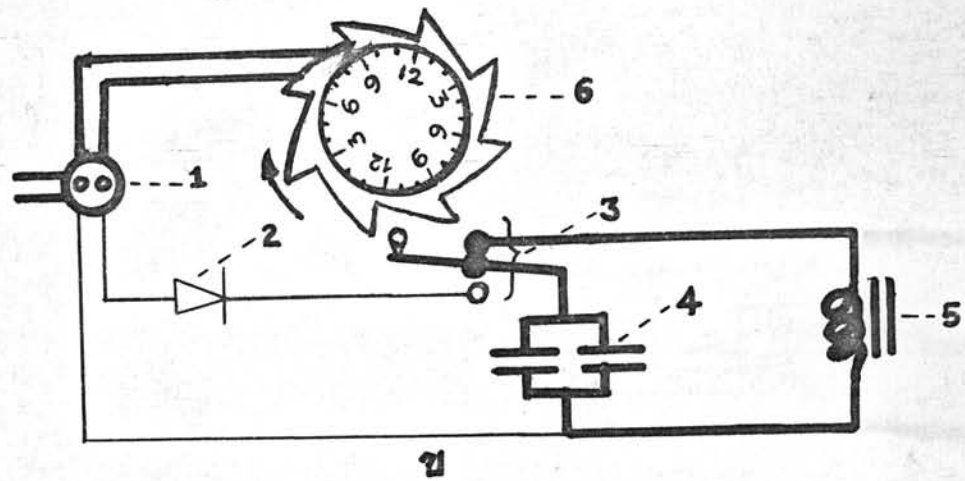
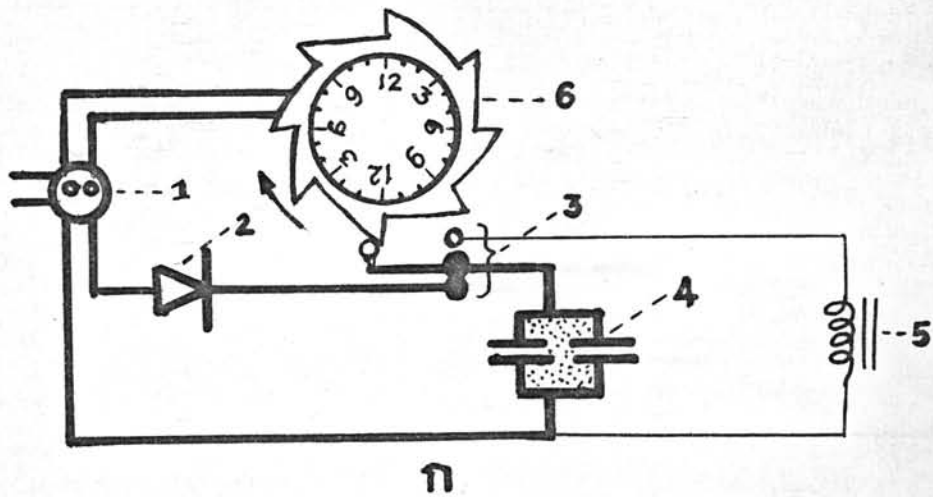
3. การจักษแสงสว่างเพื่อเลี้ยงเนื้อเยื่อและเพื่อการถ่ายภาพยนตร์

ใช้แสงไฟจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ Philips TL 20 W/54 2 หลอด เหนือหลอดไฟตู้ผ้าไว้ควยกระดามอะลูมิเนียมเพื่อให้ได้แสงสว่างเพิ่มขึ้นโดยไม่ทำให้อุณหภูมิสูงขึ้น ระยะจากหลอดไฟถึงหลอดแก้วระดับที่อยู่ของชั้นเนื้อเยื่อกล้วยไม้ห่าง 12 ซม. ความเข้มของแสงประมาณ 2200 lux ให้แสงต่อเนื่องกันตลอดเวลา อุณหภูมิประมาณ 24° ถึง 28° ซ.

4. วิธีการและหลักการถ่ายภาพยนตร์แบบ time - lapse

การถ่ายภาพแบบ time - lapse เป็นวิธีการถ่ายภาพเป็นระยะ ๆ ตามเวลาที่ตั้งไว้เมื่อสิ่งที่ยามีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างช้า ๆ การถ่ายภาพแบบ time - lapse ที่ง่ายที่สุดคือตั้งกล้องถ่ายรูปเอาไว้หนึ่ง ๆ บนสามขา แล้วถ่ายทีละภาพโดยเว้นระยะเวลาห่างเท่า ๆ กัน การใช้กล้องถ่ายภาพยนตร์นั้นมีความจำเป็นมากสำหรับบันทึกผลการเจริญและเปลี่ยนแปลงที่ต้องใช้ระยะเวลานาน ความแน่นอนของการทำงานของเครื่องอัตโนมัตินี้มีความสำคัญมาก ถ้าเครื่องหยุดทำงานหรือทำงานผิดพลาดในขณะที่งานกำลังดำเนินอยู่ ก็จะต้องเสียทั้งฟิล์มที่ถ่ายและเวลาในการทดลอง

เครื่อง time - lapse ที่นำมาประกอบเข้ากับกล้องถ่ายภาพยนตร์ Kodak Special II ขนาด 16 ม.ม. ที่ประดิษฐ์ขึ้นเป็นพิเศษนี้ การทำงานของเครื่อง time-lapse ผิดกับเครื่องที่ประดิษฐ์ขายทั่วไปตรงที่ระยะระหว่างการบันทึกภาพห่างกันถึง 3 ชั่วโมง หากใช้การบังคับแบบธรรมดาเครื่องอาจจะร้อนจัดและเสียได้ การบังคับความถี่ที่ถ่ายใช้นาฬิกาไฟฟ้าที่เดินรอบละ 24 ชั่วโมง โดยใส่แผ่นโลหะรูปวงแหวนที่มีหยักแหลม 8 หยัก ระยะระหว่างหยักห่างเท่ากัน หยักแหลมเหล่านี้จะกดไมโครสวิตซ์เพื่อปิดวงจร "charging circuit" คอนเดนเซอร์ก็จะถูก charge เอาไว้ (รูปที่ 2 ก) ระหว่างนี้วงจรระหว่างคอนเดนเซอร์กับขดลวดไฟฟ้า (solenoid) ซึ่งเป็น "discharging circuit" เปิดอยู่ เมื่อปลายแหลมของหยักหมุนผ่านเลยไป ปุ่มไมโครสวิตซ์ที่ถูกกดอยู่ก็จะถูกสปริงดันกลับที่เดิม ทำให้ charging circuit เปิดออก และ



รูปที่ 2 โค้ดแกรมแสดงวงจรไฟฟ้าและการทำงานของเครื่อง time - lapse;

ก. charging circuit; ข. discharging circuit

1. ปลั๊กไฟฟ้า 220 โวลต์,
2. เครื่องแปลงกระแสไฟฟ้าสลับให้เป็นกระแสไฟตรง,
3. ไมโครสวิตช์,
4. คอนเดนเซอร์ที่มีความจุไฟฟ้าตัวละ 100 ไมโครฟารัดต่อแบบขนาน,
5. ชลลวคที่มีแกนเป็นเหล็ก,
6. นาฬิกาไฟฟ้า

discharging circuit ระหว่างคอนเดนเซอร์กับ solenoid ปิด ไฟจะ discharge จากคอนเดนเซอร์เข้า solenoid ทำให้ solenoid เป็นแม่เหล็กไฟฟ้า (รูปที่ 2 ข.) และเป็นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีกำลังแรงมากเนื่องจากเป็น solenoid ที่มีแกนเป็นเหล็ก ในขณะที่คัมคอยล์ที่อยู่ระหว่าง solenoid จะถูกกระตุกลงมาด้วยแรงที่เกิดจากแม่เหล็กไฟฟ้าของ solenoid คัมคอยล์สำหรับถ่ายที่ละภาพที่ติดกับปลายอีกข้างหนึ่งของคัมคอยล์ ก็จะถ่ายภาพ คัมคอยล์ก็จะกลับกันทันทีเนื่องจากไฟจากคอนเดนเซอร์หมดทันทีโดยไม่ทำให้เกิดความร้อนซึ่งเป็นอันตรายต่อ solenoid ได้ ระยะเวลาที่ปลายหยักผ่านไมโครสวิตซ์แต่ละครั้งใช้เวลา 3 ชั่วโมงเท่ากันตลอด กล้องนี้จึงถ่ายวันละ 8 ภาพ

การเลือกช่วงเวลาสำหรับการถ่ายภาพแต่ละภาพ หามาจากระยะเวลาที่ต้องใช้ในการถ่ายภาพทั้งหมด กับเวลาที่ต้องการจะฉายภาพนั้นบนจอภาพยนตร์ การบันทึกภาพการเจริญและเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อกล้วยไม้นี้ ใช้เวลาช่วงหนึ่งนาน 2 เดือนจะได้ภาพปรากฏบนจอ 30 วินาที โดยฉายด้วยอัตราเร็วของภาพยนตร์ที่ไม่มีเสียงในฟิล์ม คือวินาทีละ 16 ภาพ จะหาช่วงเวลาห่างของการถ่ายแต่ละภาพได้ นั่นคือจำนวนภาพที่ต้องถ่ายทั้งหมดเป็น 16×30 เท่ากับ 480 ภาพ ใช้เวลาถ่ายนาน 2 เดือน หรือ 1440 ชั่วโมง ดังนั้นช่วงเวลาห่างของการถ่ายแต่ละภาพจึงเป็น $1440 / 480$ เท่ากับ 3 ชั่วโมง

5. การศึกษาการเจริญและเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ

004899

ชิ้นเนื้อเยื่อเล็กๆ ซึ่งเลี้ยงในหลอดแก้วที่มีวุ้นอาหารต่างกันเป็นสองพวก ชิ้นเนื้อเยื่อจะเจริญเติบโตมีปริมาตรเพิ่มขึ้นตามลำดับ จนถึงระยะหนึ่งจะเกิด protocorm-like body (plb.) ขึ้นเป็นจำนวนมาก จาก plb. เหล่านี้จะมีการเปลี่ยนแปลงกลายเป็นต้นเล็กๆ ต่อไป เมื่อเกิด plb. ซึ่งมีลักษณะคล้าย protocorm ที่เกิดจากเมล็ดก็จะเป็นก้อนเนื้อเยื่อค่อนข้างกลมปลายบนแหลมและมีสีเขียวจืด จึงนำออกมาตัดแยกเอาก้อนเนื้อเยื่อที่เป็น plb. เคี้ยวๆ ออกมา ย้ายไปเลี้ยงในหลอดแก้วที่มีวุ้นอาหารหลอดใหม่ต่อไป plb. เหล่านี้จะมีการเจริญและเปลี่ยนแปลงเป็นต้นเล็กๆ คือเกิดใบ ลำต้น และรากตามลำดับ ตลอดระยะเวลาตั้งแต่เริ่มต้นจนก้อนเนื้อเยื่อเจริญ และเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นเล็กๆ ได้บันทึกเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นโดยการถ่ายภาพยนตร์แบบ time-lapse ฟิล์มภาพยนตร์ที่-

ถ่ายแล้วล้างด้วยน้ำยาที่ทำให้เกิดภาพ Kodak D-19 ที่อุณหภูมิ 20°C. เป็นเวลา 8 นาที และทำให้ในเนกกาทีฟคงอยู่โดยตรึงในน้ำยา Kodak F-5 นาน 10 นาที แล้วล้างน้ำจนสมบูรณ์โดยล้างเนกกาทีฟในน้ำสะอาดที่มีการเคลื่อนไหว และเปลี่ยนน้ำใหม่ไม่น้อยกว่า 10 ครั้ง

6. การวิเคราะห์ผล

นำเนกกาทีฟที่ได้มาอัดขยายลงบนกระดาษอัดรูปเพื่อศึกษาและวิเคราะห์ผลจากการถ่ายภาพยนตร์ โดยอัดขยายรูปแรกและทุกๆ รูปที่ 40 ของเนกกาทีฟ การวิเคราะห์ผลนอกจากจะใช้ผลจากการถ่ายภาพยนตร์แบบ time - lapse แล้วยังวิเคราะห์ผลจากข้อมูลที่ได้จากการสังเกตบันทึกผลการเจริญและเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ โดยการวัดขนาดจากชิ้นเนื้อเยื่อในหลอดทดลองที่เลี้ยงไว้ เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อที่ถ่ายภาพยนตร์ หาความสัมพันธ์ของการเจริญของเนื้อเยื่อกับระยะเวลา