บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาการผสมพันธุ์กล้วยไม้ ในสกุล *Spathoglottis* แบ่งออกเป็น 3 การทดลองคือ

1. การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะสีดอก
2. การศึกษาความมีชีวิตของเมล็ดลูกผสม
3. การศึกษาโครโมโซม

อุปกรณ์และวิธีการทดลองมีดังนี้

การทดลองที่ 1.1 การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะสีดอก

1.1.1 วัสดุอุปกรณ์

1.1.1.1พืชทดลอง

ได้แก่ต้นพันธุ์เอื้องดินใบหมากจำนวน 4 สายพันธุ์คือ *S. affinis S. plicata S. plicata* var. *alba* และลูกผสมของ *S. vanoverburgii* × *S. affinis* ต้นคัดเลือก

1.1.1.2 อุปกรณ์

1.1.1.2.1 ภาชนะปลูกกระถางพลาสติก ขนาด 3.5 และ 6 นิ้ว สำหรับถาดหลุมพลาสติกสำหรับเพาะกล้า ขนาด 1 นิ้ว x 120 หลุม

1.1.1.2.2 วัสดุปลูกต้นกล้า : ทรายและขุยมะพร้าว อัตรา 2 : 1

1.1.1.2.3 วัสดุปลูกหลังย้ายกล้า กาบมะพร้าวสับ ปุ๋ยคอก 9 : 1

1.1.1.2.4 ปุ๋ย ปุ๋ยละลายช้า ออสโมโคส สูตร 14-14-14

1.1.1.2.5 อุปกรณ์การบันทึกข้อมูล ได้แก่ ไม้บรรทัด สมุด ดินสอ แผ่นเทียบสี ของบริษัท Munsell USA กล้องถ่ายรูป

1.1.1.3 วิธีการ

1.1.1.3.1 ทำการผสมเอื้องดินใบหมาก คู่ผสมละ 5 ฝัก ได้แก่ คู่ผสม *S. affinis* × *S. plicata* *S. affinis* × *S. plicata* var. *alba* *S. plicata* var. *alba* × *S. affinis* [*S. vanoverburgii* × *S. affinis*] × *S. plicata* var. *alba* และ [*S. vanoverburgii* × *S. affinis*] × *S. plicata*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1.1.3.2 นำฝักอายุ 30 วันไปเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ประมาณ 10 เดือนได้ต้นที่สามารถนำออกปลูกได้

1.1.1.3.3 ปลูกลงถาดเพาะกล้าพลาสติก ด้วยเครื่องปลูกทราย ผสมขุยมะพร้าว เมื่ออายุสามเดือนจึงย้ายลงปลูกในกระถาง 3.5 นิ้ว โดยใช้เครื่องปลูก กาบมะพร้าวสับผสมปุ๋ยคอก

1.1.1.3.4 บันทึกสีดอกของลูกผสม โดยทำการบันทึกผล สีและลวดลายของกลีบเลี้ยง และกลีบดอก โดยเทียบสีกับแผ่นเทียบสีมาตรฐานของบริษัท Munsell USA พร้อมทั้งถ่ายรูปดอกไว้เป็นหลักฐานอ้างอิง

การทดลองที่ 1.2 เปรียบเทียบลักษณะดอก ระหว่าง *S. vanoverburgii* × *S. affinis* ต้นคัดเลือก และ ลูกผสมที่ได้จาก S. *vanoverburgii* × *S. affinis*

1.2.1วัสดุอุปกรณ์

1.2.1.1 พืชทดลอง

ได้แก่ *S. vanoverburgii* × *S. affinis* เป็นต้นที่คัดเลือกจากประชากรจากลักษณะดอกหนา สีเข้ม ก้านตรง และ *S. vanoverburgii* × *S. affinis* 10 โคลน สุ่มเลือกจากประชากร

1.2.1.2 วัสดุ เครื่องมือ อุปกรณ์

1.2.1.1 กล้องถ่ายรูป

1.2.1.2 เครื่องอบ hot air oven

1.2.1.3 ถุงกระดาษ

1.2.1.4 เครื่องชั่ง ดิจิตอล แบบทศนิยมสามตำแหน่ง

1.1.2.5 กระดาษกรอง

1.2.3 วิธีการ

1.2.3.1 นำดอกของกล้วยไม้ มาบันทึก สีขนาด และลวดลายบนดอกตลอดจนบรรยายลักษณะทางกายภาพอื่นๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.3.2 นำไปใส่ในถุงกระดาษ แล้วอบในเครื่องอบแบบ hot air oven เป็นเวลา 1 สัปดาห์

1.2.3.3 นำดอกแห้งที่ได้มาชั่งน้ำหนักแห้ง ด้วยเครื่องชั่งดิจิตอล แบบทศนิยมสามตำแหน่ง

การทดลองที่ 2 การศึกษาโครโมโซม

ศึกษาโครโมโซมจากปลายรากพืชทดลอง ด้วยวิธีการขยี้เซลล์ ตามเทคนิค Feulgen's squash ที่ดัดแปลงโดยจารุวรรณ (2550)

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1 พืชทดลอง

ปลายรากของกล้วยไม้สกุล *Spathoglottis* พันธุ์แท้ 6 ชนิดได้แก่ *S. afiinis S. hardingiana S. kimballiana S. petri S. plicata S. vanoverburgii* และลูกผสม จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. vanoverburgii × S. affinis และ (S. vanoverburgii × S. affinis) × S. plicata*

2.1.2 อุปกรณ์ในการตรวจนับโครโมโซม

2.1.2.1 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิให้เป็น 60° ซ

2.1.2.2 ปรอทวัดความร้อน

2.1.2.3 กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope) และมีอุปกรณ์ในถ่ายภาพ

2.1.2.4 อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดแก้วขนาดเล็ก แผ่นกระจกปิดสไลด์ สไลด์ หลอด vial พร้อมฝาปิด กระบอกตวงสารเคมี และบีกเกอร์

2.1.2.5 ใบมีดผ่าตัดพร้อมด้าม

2.1.2.6 ปากคีบและเข็มเขี่ย

2.1.2.7 ปากกาเมจิกชนิดถาวร

2.1.2.8 กระดาษซับ

2.1.2.9 ป้ายติดกาว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.3 สารเคมี

2.1.3.1 สารละลายอิ่มตัว paradiclorobenzene (PDB) เป็น pre-treatment solution

2.1.3.2 น้ำยาตรึงเซลล์ (fixative solution) เพื่อรักษาสภาพ และหยุดการทำงานของ เซลล์ประกอบด้วย absolute ethyl alcohol 3 ส่วน และ glacial acetic 1 ส่วน

2.1.3.3 ethyl alcohol 70 %

2.1.3.4 hydro chloric acid เข้มข้น 1 นอร์มอล (1N HCl)

2.1.3.5 carbol fuchsin 5 และ 10 %

2.1.3.6 น้ำยาเคลือบเล็บ

2.1.4 วิธีการทดลอง

2.1.4.1 เก็บตัวอย่างปลายราก ในระหว่างช่วงเวลา 8.30 น. - 9.00 น.

2.1.4.2 แช่ปลายรากในสารละลายอิ่มตัว PDB ใช้เป็น pre-treatment เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

2.1.4.3 นำปลายรากออกมาซับด้วยกระดาษซับและล้างด้วยน้ำกลั่นสามครั้ง จากนั้นนำแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ นาน 5 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเซลล์

2.1.4.4 ย่อยเซลล์ให้แยกจากกันโดยการแช่รากใน 1N HCL ที่อุณหภูมิ 60° ซ นาน 5นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น

2.1.4.5 ย้อมเนื้อเยื่อปลายรากด้วย สารละลายสี carbon fuchin เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นคีบเนื้อเยื่อวางลงบนแผ่นสไลด์ ใช้มีดผ่าตัดตัดเอาเฉพาะส่วนปลายรากยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร ใช้เข็มเขี่ยขยี้ปลายรากเพื่อให้เซลล์กระจายตัว คีบเนื้อเยื่อส่วนที่เป็นเยื่อหุ้มปลายรากออกเหลือไว้เฉพาะเนื้อเยื่อเจริญที่อยู่ภายใน หยดสีย้อมอีกหนึ่งหยด แล้วปิดแผ่นสไลด์ โดยใช้กระดาษซับวางบนแผ่นสไลด์ กดแผ่นกระจกปิดสไลด์ด้วยนิ้วหัวแม่มือ เพื่อให้เซลล์กระจาย แล้วซับสีที่ล้นออกจากกระจกแผ่นกระจกปิดสไลด์

2.1.4.6 นำแผ่นกระจกสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมตาเฟส และมีการกระจายตัวของโครโมโซมดีอย่างน้อย 10 เซลล์ สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้แม่นยำ เมื่อได้เซลล์ที่ต้องการแล้วกดแผ่นกระจกปิดสไลด์เบาๆ เพื่อให้เซลล์แบนราบ และอยู่ในระนาบเดียวกัน ผึ่งลมทิ้งไว้ระวังอย่าให้อากาศเข้า ใช้น้ำยาเคลือบเล็บทาบนแผ่นกระจกปิดสไลด์เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์แห้ง นำแผ่นกระจกสไลด์ไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อนับจำนวนโครโมโซมและ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บันทึกภาพนำแผ่นสไลด์ ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยนำเซลล์ ที่มีการแบ่งเซลล์ในระยะเมตาเฟส และเป็นเซลล์ที่มีโครโมโซม ขดตัวแน่น และกระจายตัวดี สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้ เมื่อได้เซลล์ที่ต้องการแล้ว ทำการบันทึกภาพจากกล้องจุลทรรศน์

การทดลองที่ 3 การศึกษาความสมบูรณ์ของเมล็ดกล้วยไม้

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 พืชทดลอง กล้วยไม้สกุล *Spathoglottis* จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *S. affinis* *S. plicata* *S. kimballiana* และ *S. vanoverburgii*

3.1.2 วัสดุ เครื่องมือ อุปกรณ์

3.1.2.1 กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope) และมีอุปกรณ์ในการถ่ายภาพ

3.1.2.2 คอมพิวเตอร์ใช้ในการตรวจนับเมล็ด

3.1.2.3 ด้ายสำหรับผูกแทกพลาสติก

3.1.2.4 อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดแก้วขนาดเล็ก แผ่นกระจกปิดสไลด์ สไลด์ หลอด vial พร้อมฝาปิด กระบอกตวงสารเคมี และบีกเกอร์

3.1.2.5 ปากกาเมจิกชนิดถาวร

3.1.2.6 กระดาษซับ

3.1.2.7 ป้ายแทกพลาสติกเจาะรูตรงปลาย

3.1.2.8 มีดผ่าตัด

3.1.2.9 กระดาษกรองสี

3.1.3 สารเคมี

3.1.3.1 neutral red

3.1.3.2 aceto orcein 10 %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.4 วิธีการทดลอง

3.1.4.1 ผสมพันธุ์กล้วยไม้โดยวิธีผสมเกสรเมื่อดอกบานได้สองวัน เขียนชื่อคู่ผสมผูกติดกับก้านช่อดอกไว้หลวมๆ คู่ผสมละ 5 ดอก จากนั้นเก็บฝักเมื่อฝักแก่จัด คือ เริ่มปริตามรอยตะเข็บ อายุฝักประมาณ 35-45 วัน

3.1.4.2 ใช้มีดผ่าตัด ผ่าเมล็ดแล้วใส่ใส่ในหลอด vial ใส่น้ำและสี จำนวนอย่างละสองหยด ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที

3.1.4.3 นำไปเมล็ดไปล้างด้วยน้ำสองครั้งโดยห่อด้วยกระดาษกรอง

3.1.4.4 เตรียมในสไลด์โดยการหยดน้ำเปล่าหยดลงบนสไลด์ที่มีเมล็ดเกลี่ยให้สม่ำเสมอ แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

3.1.4.5 ส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ถ่ายภาพสไลด์ละ 5 ภาพ

3.1.4.6 นำภาพที่ได้มานับจำนวนเมล็ดที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตในคอมพิวเตอร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved