

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาพื้นฐานวิทยาและความสามารถในการผสมข้ามของกล้วยไม้ดินสกุลฮาเบนาเรีย และสกุลเพคเทลิสบางชนิด แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการทดลองที่ 2 ความสามารถในการผสมตัวเอง และผสมข้ามของกล้วยไม้ดินสกุลฮาเบนาเรียและสกุลเพคเทลิสบางชนิด

การทดลองที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 กล้วยไม้ดินสกุลฮาเบนาเรียและสกุลเพคเทลิสจำนวน 9 ชนิด (ภาพที่ 2)

1.1.1 กล้วยไม้ดินสกุลฮาเบนาเรีย 7 ชนิด ได้แก่

- *H. carnea* N.E. Brown (ลิ้นมังกรสีชมพูใบจุด)
- *H. erichmichaelii* Christenson (ลิ้นมังกรสีชมพู)
- *H. lindleyana* Steud. (นางกราย)
- *H. lucida* Wall. Ex Lindl. (หอมเตย)
- *H. myriotricha* Gagnep. (นางอ้วปากฝอยเมืองจันทน์)
- *H. rhodocheila* Hance (ลิ้นมังกรสีส้ม สีส้มแดง สีแดง และสีชมพูหวาน)
- *H. xanthocheila* Ridl. (ลิ้นมังกรสีเหลือง)

1.1.2 กล้วยไม้ดินสกุลเพคเทลิส 2 ชนิด ได้แก่

- *P. sagarikii* Seidenfaden (นางอ้วสาคริปากสีขาว และปากสีเหลือง)
- *P. susannae* (นางอ้วใหญ่จากแหล่งภาคใต้)

1.2 เวอร์เนียคาลิปเปอร์

1.3 ไม้บรรทัด

1.4 แผ่นเทียบสี (RSH colour chart)

1.5 ฟิล์มเจอร์บอร์ค

1.6 สมุดบันทึก

1.7 ดินสอ

1.8 แปรงสีฟัน

1.9 กะละมัง

1.10 กล้องถ่ายภาพดิจิทัล

2. วิธีการทดลอง

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของส่วนประกอบของกล้วยไม้ดินสกุลฮาเบนาเรีย และสกุลเพกเทลิสบางชนิด ได้แก่ หัว ราก ลำต้น ใบ และดอก ในระยะที่ส่วนต่าง ๆ ของต้นเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว โดยบันทึกข้อมูลดังกล่าวจากต้นพืชที่นำมาศึกษา 5 ต้น ต่อ 1 ชนิด ดังนี้

2.1 ลักษณะของหัว

2.2 จำนวนหัวต่อต้น

2.3 ขนาดของหัว วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและความยาวของหัว แต่หัวบางชนิดมีลักษณะแบน ให้บันทึกความกว้าง ความยาว และความสูงของหัว

2.4 ลักษณะของราก

2.5 จำนวนของรากต่อต้น

2.6 ขนาดของราก วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและความยาวของราก

2.7 ขนาดของลำต้น วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและความยาวของลำต้นจากโคนต้นถึงใต้ใบคู่ที่ 1 นับจากโคนต้น

2.8 ลักษณะของใบ และรูปใบ

2.9 ลักษณะของการจัดเรียงตัวของใบ

2.10 จำนวนใบต่อต้น

2.11 ขนาดของใบ วัดความกว้างจากส่วนที่กว้างที่สุดและความยาวของใบจากโคนใบถึงปลายใบ โดยวัดใบที่ 2 นับจากโคนต้น

2.12 ลักษณะของช่อดอก

2.13 ขนาดของช่อดอก วัดความกว้างจากส่วนที่กว้างที่สุดและความยาวของช่อดอกจากข้อที่เกิดดอกแรกถึงปลายสุด

2.14 ขนาดของก้านช่อดอกรวม (Peduncle) วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและความยาวของก้านช่อดอกจากโคนต้นถึงปลายสุดของช่อดอก

2.15 จำนวนดอกต่อช่อ

2.16 ลักษณะของกลีบเลี้ยงและกลีบดอก

2.17 ลักษณะของกลุ่มเรณู (Pollinia) และเกสรเพศเมีย (Stigma)

2.18 ขนาดของเดือย วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและความยาวของเดือยที่ต่อออกมาจากโคนกลีบดอก



ภาพที่ 2 ลักษณะของกล้วยไม้ดินสกุลฮาเบนาเรียและสกุลเพคเทลิส 9 ชนิด

ก) *H. carnea*; ข) *H. erichmichaelii*; ค) *H. lindleyana*; ง) *H. lucida*; จ) *H. myriotricha*;
 ฉ-ณ) *H. rhodocheila* ที่มีรูปทรงและสีดอกแตกต่างกัน (ฉ) สีส้ม (ช) สีส้มแดง (ซ) สีแดง
 (ฌ) สีชมพูหวาน; ญ) *H. xanthocheila*; ฎ) *P. sagarikii* ปากสีขาว; ฏ) *P. sagarikii* ปาก
 สีเหลือง; ฐ) *P. susannae*

- ของก้านดอกย่อย
- 2.19 ลักษณะของก้านดอกย่อย (Pedicel)
 - 2.20 ขนาดของก้านดอกย่อย วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและความยาว
 - 2.21 ลักษณะของใบประดับ (Bract)
 - 2.22 ขนาดของใบประดับ วัดความกว้างจากส่วนที่กว้างที่สุดและความยาวของใบประดับจากโคนใบถึงปลายใบ โดยวัดใบประดับที่ 2 นับจากโคนต้น
 - 2.23 ลักษณะใบประดับย่อย (Bracteole)
 - 2.24 ขนาดของใบประดับย่อย วัดความกว้างจากส่วนที่กว้างที่สุดและความยาวของใบประดับย่อยจากโคนใบถึงปลายใบ โดยวัดใบประดับย่อยของดอกที่ 2 นับจากโคนของช่อดอกจากข้อที่เกิดดอกแรก
 - 2.25 ลักษณะของฝัก

การทดลองที่ 2 ความสามารถในการผสมตัวเอง และผสมข้าม

ศึกษาความสามารถในการผสมตัวเอง ผสมข้ามชนิด และผสมข้ามสกุลของกล้วยไม้ดินสกุลฮาเบนาเรีย 7 ชนิด และสกุลเพคเทลิส 2 ชนิด

การผสมพันธุ์และการติดฝัก

1. วัสดุและอุปกรณ์

- 1.1 กล้วยไม้ดินสกุลฮาเบนาเรีย 7 ชนิด และสกุลเพคเทลิส 2 ชนิด (จากการทดลองที่ 1)
- 1.2 ไม้จิ้มฟัน
- 1.3 หลอดขนาดเล็กมีฝาปิด (Tube)
- 1.4 แผ่นป้าย
- 1.5 เส้นด้าย
- 1.6 เข็ม
- 1.7 ฟิล์มเจอร์บอร์ค
- 1.8 สมุดบันทึก
- 1.9 ดินสอ
- 1.10 ไม้บรรทัด
- 1.11 กล้องถ่ายภาพดิจิทัล

2. วิธีการทดลอง

คัดเลือกต้นพ่อแม่พันธุ์ทั้ง 9 ชนิด ที่มีลักษณะดี สมบูรณ์แข็งแรง ไม่มีโรคและแมลง ดอกมีสีสดใส มาควบคุมให้มีการผสมตัวเอง ผสมข้ามชนิด ภายในสกุลฮาเบนาเรีย และผสมข้ามสกุล ระหว่างชนิดของสกุลฮาเบนาเรียและชนิดของสกุลเพคเทลิส การถ่ายละอองเกสรทำในตอนเช้า เวลา 9.00-11.00 น. โดยใช้ไม้จิ้มฟันสะอาดเขี่ยเกสรเพศผู้ออกมา แล้วนำไปใส่ยอดเกสรเพศเมียซึ่งเป็นอ่างที่มีน้ำเมือกเหนียว แต่ละคู่ผสมให้ได้มากที่สุดเท่าจำนวนดอกที่บ้านในแต่ละช่วงเวลา แล้วนำฝักที่ได้จากการผสมตัวเอง ผสมข้ามชนิด และผสมข้ามสกุล มาเพาะในสภาพปลอดเชื้อเพื่อทดสอบการงอกของเมล็ด และตรวจสอบเมล็ดที่สมบูรณ์

การตรวจสอบเมล็ดที่สมบูรณ์

ตรวจสอบเมล็ดที่สมบูรณ์โดยดัดแปลงวิธีของอรอนงค์ (2553)

1. วัสดุและอุปกรณ์

- 1.1 เมล็ดกล้วยไม้ดินที่ได้จากการผสมตัวเอง ผสมข้ามชนิด และผสมข้ามสกุล
- 1.2 สไลด์
- 1.3 แผ่นปิดสไลด์
- 1.4 ปากคีบ
- 1.5 เข็มเขี่ย
- 1.6 มีดผ่าตัด
- 1.7 กล้องจุลทรรศน์ชนิด Compound
- 1.8 กล้องถ่ายภาพดิจิทัล

2. สารเคมี

สีที่ใช้ย้อมในการตรวจสอบเมล็ดที่สมบูรณ์ คือ Lacto propionic orcein ซึ่งเตรียมเป็น Stock solution โดยชั่ง Orcein 2 กรัม ละลายในส่วนผสมของ Lactic acid 50 มิลลิลิตร และ Propionic acid 50 มิลลิลิตร โดยแช่ทิ้งไว้ค้างคืนแล้วจึงนำมากรอง ในการนำสีมาใช้ให้นำ Stock solution มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยน้ำกลั่น กรองอีกครั้งหนึ่ง แล้วบรรจุในขวดสีชา

3. วิธีการทดลอง

นำเมล็ดกล้วยไม้ดินที่ได้จากการผสมตัวเอง ผสมข้ามชนิด และผสมข้ามสกุล มาตรวจสอบเมล็ดที่สมบูรณ์ โดยใช้เข็มเขี่ยที่สะอาด เขี่ยเมล็ดลงบนสไลด์เล็กน้อย หยดสีย้อม Lacto propionic orcein 1 หยด ตรงบริเวณเมล็ด แล้วใช้เข็มเขี่ยเกลี่ยเมล็ดให้กระจาย ปิดด้วยแผ่น

ปิดสไลด์ นำกระดาษซับวางลงบนสไลด์บริเวณที่ปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ ใช้หัวแม่มือกดเบา ๆ เพื่อ
 ซับสีที่เป็นส่วนเกิน นำสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดย 1 ผัก ทำ 3 ซ้ำ

การทดสอบการงอกของเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ

1. วัสดุและอุปกรณ์

- 1.1 ฝีกกล้วยไม้ดินที่ได้จากการผสมตัวเอง ผสมข้ามชนิด และผสมข้ามสกุล
- 1.2 ตู้ยี่ห้อ (Laminar air-flow cabinet)
- 1.3 เครื่องชั่งสารชนิดละเอียด (Analytical balance) ทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- 1.4 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- 1.5 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
- 1.6 เต้าไมโครเวฟ
- 1.7 ขวดทดลองสำหรับเพาะเมล็ด
- 1.8 ขวดใส่สารละลายเข้มข้น
- 1.9 ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
- 1.10 กระบอกตวง (Cylinder)
- 1.11 ปีกเกอร์ (Beaker)
- 1.12 แท่งแก้วคนสาร (Glass rod)
- 1.13 ปิเปต (Pipette)
- 1.14 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
- 1.15 หลอดหยด
- 1.16 ช้อนตักสาร
- 1.17 กระดาษลอกลายสำหรับหุ้มปากขวด
- 1.18 ยางรัด
- 1.19 กระดาษอลูมิเนียมฟอยล์
- 1.20 แผ่นป้าย
- 1.21 ชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีระบบให้แสงฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสงประมาณ $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
- 1.22 อุปกรณ์ที่ใช้ในตู้ยี่ห้อ (ได้แก่)
 - 1.22.1 คีมมีดผ่าตัด
 - 1.22.2 ไขมีดผ่าตัดเบอร์ 10 และ 11
 - 1.22.3 ปากคีม (Forceps)

1.22.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.22.5 หลอดทดลองใส่แอลกอฮอล์ขนาด 25×150 มิลลิเมตร

1.22.6 จานแก้ว (Petri dish)

1.22.7 กระจาดกรอง (Filter-dish)

1.22.8 ถูพลาสติกทนร้อนขนาด 70×90 มิลลิเมตร

1.23 วัสดุอื่น ๆ

1.23.1 กระจาดทิชชู

1.23.2 ไม้ขีดไฟ

1.23.3 ถูมือกันความร้อน

1.23.4 ดินสอ

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับทำความสะอาดและฆ่าเชื้อ ได้แก่

2.1.1 เอทานอล (Ethanol) ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์

2.1.2 คลอโรกซ์ (Clorox)

2.1.3 สารลดแรงตึงผิว tween 80

2.1.4 ไลปอนเอฟ

2.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมอาหาร ได้แก่

2.2.1 ธาตุอาหารหลักสูตร CMU 1 (ปิยะนุช, 2547) (ตารางที่ 1)

2.2.2 ธาตุอาหารรองสูตร Murashige and Skoog (1962) (MS, 1962) (ตารางที่ 2)

2.2.3 สารอินทรีย์สูตร MS (1962) (ตารางที่ 3)

2.2.4 สารละลายเหล็กสูตร MS (1962) (ตารางที่ 4)

2.2.5 โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ความเข้มข้น 1 M

2.2.6 กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 1 M

2.2.7 น้ำตาลซูโครส

2.2.8 ผงวุ้น

2.2.9 น้ำมะพร้าว

2.2.10 น้ำกลั่น

3. วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมสารละลายเข้มข้น (Stock solution)

3.1.1 การเตรียมธาตุอาหารหลัก

การเตรียมสารละลายของธาตุอาหารหลักสูตร CMU 1 โดยเตรียมเป็นสารละลายความเข้มข้น 20 เท่า (20X) ของสูตรมาตรฐาน โดยชั่งสารแต่ละชนิดตามตารางที่ 1 ละลายสารแต่ละชนิดในน้ำกลั่น เตรียมให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร แล้วเทใส่ขวดสำหรับบรรจุสารละลาย ปิดฝาเก็บสารละลายเข้มข้นนี้ไว้ในตู้เย็น

ตารางที่ 1 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร CMU 1

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร CMU 1 (มิลลิกรัม/ลิตร)	ปริมาณสารในสารละลายเข้มข้น 20X (กรัม/ลิตร)
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	151	3.022
KNO ₃	525	10.494
KH ₂ PO ₄	250	5.008
MgSO ₄ ·7H ₂ O	249	4.978
(NH ₄) ₂ SO ₄	499	9.988

3.1.2 การเตรียมธาตุอาหารรอง

การเตรียมสารละลายของธาตุอาหารรองสูตร MS (1962) โดยเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน ให้ความเข้มข้นของสารเป็น 100 เท่า (100X) ของสูตรมาตรฐาน เตรียมให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ปริมาณสารเคมีแต่ละชนิดตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรองสูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มิลลิกรัม/ลิตร)	ปริมาณสารในสารละลายเข้มข้น 100X (กรัม/ลิตร)
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.0025
KI	0.840	0.0840
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.600	0.8600
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16.900	1.6900
H_3BO_3	6.200	0.6200
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.250	0.0250
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.0025

3.1.3 การเตรียมสารอินทรีย์

การเตรียมสารอินทรีย์สูตร MS (1962) โดยเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน ให้ความเข้มข้นของสารเป็น 100 เท่า (100X) ของสูตรมาตรฐาน เตรียมให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ปริมาณสารเคมีแต่ละชนิดตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของสารอินทรีย์สูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มิลลิกรัม/ลิตร)	ปริมาณสารในสารละลายเข้มข้น 100X (กรัม/ลิตร)
Glycine	2.00	0.2000
Myo-inositol	100.00	10.0000
Thiamine.HCl	0.25	0.0250
Pyridoxine.HCl	0.25	0.0250
Nicotinic acid	0.25	0.0250

3.1.4 การเตรียมสารละลายหลัก

เตรียม FeEDTA สูตร MS (1962) ซึ่งประกอบด้วย $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ โดยเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน ให้ความเข้มข้นของสารเป็น 100 เท่า (100X) ของสูตรมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งสารแต่ละชนิดตามตารางที่ 4 ละลายใน

น้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายของแต่ละสารเป็น 500 มิลลิลิตร แล้วจึงนำมาผสมไว้ในขวดเดียวกัน โดยใช้ขวดสีชาเพื่อป้องกันแสง

ตารางที่ 4 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของเหล็กสูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มิลลิกรัม/ลิตร)	ปริมาณสารในสารละลายเข้มข้น 100X (กรัม/ลิตร)
FeSO ₄ ·7H ₂ O	37.30	3.73
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	27.80	2.78

3.2 การเตรียมอาหาร

นำส่วนประกอบของอาหารสูตร VW 152 คัดแปลง จากสารละลายเข้มข้นที่เตรียมไว้แล้วข้างต้นมาผสมให้เข้ากัน โดยใช้ปริมาณของสารแต่ละชนิดตามตารางที่ 5 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 5.7 โดยใช้ KOH หรือ HCl จากนั้นใส่ลงในอาหารแล้วนำไปต้มจนวันละลาย นำอาหารมาใส่ในขวดทดลองขวดละ 30 มิลลิลิตร ปิดปากขวดด้วยฝาปิด แล้วนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบของอาหารสูตร VW 152 คัดแปลง ปริมาตร 3 ลิตร

ชนิดของสาร	ปริมาณสารและสารละลายเข้มข้น ในอาหารสูตร VW 152 คัดแปลง ปริมาตร 3 ลิตร (มิลลิลิตร)
1. ธาตุอาหารหลักสูตร CMU 1 (20X)	150
2. ธาตุอาหารรองสูตร MS (1962) (100X)	30
3. สารอินทรีย์สูตร MS (1962) (100X)	30
4. สารละลายเหล็กสูตร MS (1962) (100X)	30
5. น้ำมะพร้าว	450 (15 %)
6. น้ำตาล	60 กรัม (2 %)
7. ไขมัน	24 กรัม (0.8 %)

3.3 การเตรียมชิ้นส่วนพืช

นำฝักกล้วยไม้ดินที่ได้จากการผสมตัวเอง ผสมข้ามชนิด และผสมข้ามสกุล มาตัดขั้วและปลายฝักออกเล็กน้อย นำมาล้างด้วยไลปอนเอฟและตามด้วยน้ำสะอาด ซับให้แห้ง แช่ในแอลกอฮอล์นาน 1 นาที ซับให้แห้งอีกครั้ง แล้วนำมาฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายคลอโรกซ์ (6.0%) ความเข้มข้น 1.2% โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) นาน 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ทำในตู้ปลอดเชื้อ

3.4 การเพาะเมล็ด

นำฝักกล้วยไม้ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว มาตัดขั้วและปลายฝักออก ผ่ากลางฝัก แล้วแยกฝักออก ใช้มีดเขี่ยเมล็ดใส่ในขวดที่มีอาหารสูตร VW 152 คัดแปลง ที่เตรียมไว้ โดยเขี่ยเมล็ดลงไปปริมาตร $\frac{1}{2}$ ฝักต่อขวด ใช้แผ่นพลาสติกปิดปากขวด มัดด้วยยางรัด เขียนวันที่ทำการทดลอง ชื่อคู่ผสมลงบนแผ่นป้ายแล้วติดไว้บนขวด นำไปวางไว้บนชั้นที่ไม่ให้แสง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การบันทึกข้อมูล

1. เปอร์เซ็นต์การติดฝัก โดยคำนวณจากจำนวนฝักที่ได้ต่อจำนวนดอกที่ได้ผสมเกสรของแต่ละคู่ผสม
2. เปอร์เซ็นต์เมล็ดที่สมบูรณ์ โดยคำนวณจากจำนวนเมล็ดที่สมบูรณ์ต่อจำนวนเมล็ดทั้งหมด
3. ปริมาณการงอกของเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ โดยดูปริมาณการงอกของเมล็ดต่อพื้นที่ขวดทั้งหมด และบันทึกจำนวนวันที่ใช้ในการงอก เก็บข้อมูลทุกสัปดาห์เป็นเวลา 6 เดือน