บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาความสามารถในการผสมข้ามหมู่ของกล้วยไม้สกุลซิมบิเดียมบางชนิด แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 การผสมพันธุ์และการติดฝัก การทดลองที่ 2 ความสมบูรณ์ของเมล็ดกล้วยไม้ที่ผสมติด และการทดลองที่ 3 จำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลซิมบิเดียม

การทดลองที่ 1 การผสมพันธุ์และการติดฝัก

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 ต้นกล้วยไม้ซิมบิเดียม ทั้งหมด 3 หมู่ ได้แก่ *Iridorchis* *Cymbidium* และ *Jensoa* และพันธุ์ลูกผสม ประกอบด้วย 5 ชนิด และ 2 สายพันธุ์ (ภาพที่ 8) ดังนี้

1.1.1 หมู่ *Iridorchis* ได้แก่ ซิมบิเดียมสำเภางาม (*C. insigne* Rolfe) ซิมบิเดียมปากนกแก้ว [*C. lowianum* (Rchb. f.) Rchb.f] และ ซิมบิเดียมอินทนนท์ [*C. tracyanum* (L.) Castle]

1.1.2 หมู่ *Cymbidium* ได้แก่ กาเรการ่อน [*C. aloifolium* (L.) Sw.]

1.1.3 หมู่ *Jensoa* ได้แก่ กาเรการ่อนนิล [*C. sinense* (Jacks.) Willd.]

1.1.4 ซิมบิเดียมลูกผสม ได้แก่ ซิมบิเดียมโกลเดนเอลฟ์ (*C.* Golden Elf) และกล้วยไม้ซิมบิเดียมลูกผสมดอกสีชมพู [*C.* hybrid (pink flower)]

1.2 อุปกรณ์ในการผสมพันธุ์และการติดฝัก ได้แก่ ไม้จิ้มฟัน มีด ถุงซิป ป้ายแขวน สมุดบันทึก และกล้องถ่ายภาพดิจิตอล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 8 กล้วยไม้ซิมบิเดียม 5 ชนิด และลูกผสม 2 สายพันธุ์ ก) *C. insigne* Rolfe.; ข) *C. lowianum* (Rchb. f.) Rchb.f.; ค) *C. tracyanum* (L.) Castle.; ง) *C. aloifolium* (L.) Sw.; จ) *C. sinense* (Jacks.) Willd.; ฉ) *C.* Golden Elf; ช) *C.* hybrid (pink flower)

2. วิธีการทดลอง

2.1 คัดเลือกพ่อและแม่พันธุ์ ต้นที่ใช้เป็นพ่อและแม่พันธุ์เป็นต้นที่มีลักษณะดี ดอกที่ใช้เป็นแม่พันธุ์ มีอายุการบานอยู่ในช่วงที่เหมาะสม ดอกมีสีสันสดใส และตรวจดูว่าดอกพร้อมที่จะรับเกสรเพศผู้หรือไม่ โดยดูจากแอ่งของเกสรเพศเมีย (stigma) มีน้ำเมือกเหนียว (stigmatic fluid) และสังเกตดูด้วยว่ายังไม่มีเกสรเพศผู้เข้าไปปนเปื้อนอยู่ (ภาพที่ 9)

ภาพที่ 9 แอ่งเกสรเพศเมียมีน้ำเมือกเหนียว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 เกสรเพศผู้ที่นำมาใช้ในการผสมพันธุ์ ไม่ควรแก่เกินไป สังเกตได้จากฝาปิดเกสรเพศผู้มีสีขาวสดใส ไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือดำ (ภาพที่ 10)

ภาพที่ 10 ฝาปิดเกสรเพศผู้มีสีขาว ก) เมื่อเปิดฝาเกสรเพศผู้ออก เกสรเพศผู้ภายในมีสีเหลืองสดใส; ข) เกสรเพศผู้นำไปใช้ในการผสมพันธุ์ได้

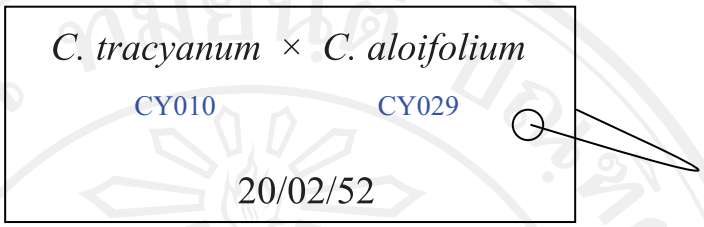
2.3 การถ่ายละอองเกสร ทำในตอนเช้า ช่วงเวลา 8:00-10:00 น. หรือในช่วงที่อากาศไม่ร้อนจัด เพราะอากาศที่ร้อนจัด ทำให้เกสรเพศผู้และเกสรเพศเมียแห้งได้

2.4 เมื่อสามารถเลือกดอกที่จะใช้เป็นพ่อและแม่พันธุ์ได้แล้ว และระยะเวลาเหมาะสมที่จะทำการถ่ายละอองเกสร สามารถทำการถ่ายละอองเกสรได้ โดยใช้ไม้จิ้มฟันสะอาด เขี่ยฝาปิดเกสรเพศผู้ให้เกสรเพศผู้หลุดออกมา แล้วแตะเกสรเพศผู้ไปวางบนเกสรเพศเมีย (ภาพที่ 11) ในบางครั้ง ถ้าเกสรเพศผู้เขี่ยติดได้ยาก ให้เอาปลายไม้จิ้มฟันไปแตะที่แอ่งเกสรเพศเมียก่อน แล้วนำมาแตะที่เกสรเพศผู้ ทำให้เกสรเพศผู้ยึดติดกับปลายไม้จิ้มฟันได้ดีขึ้น

ภาพที่ 11 เกสรเพศผู้ที่สมบูรณ์ใส่ลงไปในแอ่งเกสรเพศเมีย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5 ทำป้ายแขวนไว้ที่ก้านดอกย่อย โดยเขียนชื่อ แม่พันธุ์ × พ่อพันธุ์ วันที่เดือนปี ที่ทำการผสม (ภาพที่ 12) ในบางครั้งใช้เป็น code ที่ผู้ผสมพันธุ์มีการบันทึกอยู่ในสมุดคู่มือ (ตัวหนังสือสีน้ำเงิน)



ภาพที่ 12 ตัวอย่างของป้ายที่เขียน เพื่อใช้บอกคู่ผสมและวันเดือนปี

2.6 หลังจากการผสมเกสรไปได้ประมาณ 3-4 วัน สามารถตรวจสอบได้ว่า การผสมพันธุ์กล้วยไม้ทำได้สำเร็จหรือไม่ โดยดูจากการขยายขนาดของเส้าเกสร ถ้าการผสมเกิดขึ้นได้ เส้าเกสรจะมีการขยายขนาด และต่อมาจะสังเกตเห็นว่าส่วนของรังไข่ (ก้านดอกย่อย หรือ pedicel) มีการเปลี่ยนสีจากขาวเป็นเขียว และมีการขยายขนาดไปเรื่อยๆ (ภาพที่ 13)

ภาพที่ 13 ฝักกล้วยไม้ซิมบิเดียม เมื่อมีการผสมพันธุ์ ส่วนของก้านดอกมีการพัฒนาไปเป็นฝัก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 ความสมบูรณ์ของเมล็ดกล้วยไม้ที่ผสมติด

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 ฝักกล้วยไม้ที่ได้จากการทดลองที่ 1

1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบความแข็งแรงของเมล็ดกล้วยไม้ ได้แก่ มีดผ่าตัด ปากคีบ เข็มเขี่ย สไลด์ แผ่นปิดสไลด์ บิกเกอร์ หลอดดูด และกล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope และ photomicroscope

1.3 สารเคมี

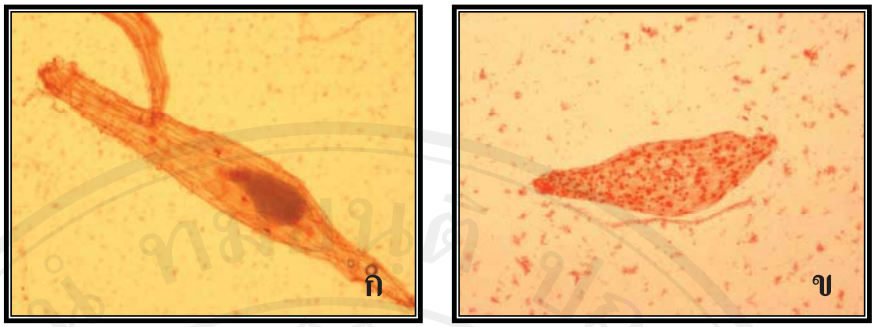
1.3.1 สีที่ใช้ย้อมในการดูความมีชีวิตของเมล็ด ได้แก่ lacto-propionic orcein ซึ่งเตรียมเป็น stock solution โดยชั่ง orcein 2 กรัม ละลายในส่วนผสมของ lactic acid 50 มิลลิลิตร และ propionic acid 50 มิลลิลิตร โดยแช่ทิ้งไว้ค้างคืนแล้วจึงนำมากรอง ในการนำมาใช้ให้นำ stock solution มาเจือจางโดยใช้น้ำ ให้มีความเข้มข้นระหว่าง 45 ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ แล้วกรองอีกครั้งหนึ่ง แล้วบรรจุในขวดสีชาและเก็บไว้ในตู้เย็น

2. วิธีการทดลอง

2.1 นำฝักกล้วยไม้ที่ได้จากการทดลองที่ 1 มาทำการเปิดฝัก โดยใช้มีดผ่าครึ่ง แล้วใช้เข็มเขี่ย เขี่ยเอาเมล็ดกล้วยไม้ลงไปในบิกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นอยู่

2.2 ใช้หลอดดูด ทำการดูดเข้า-ออก เพื่อให้เมล็ดกล้วยไม้มีการกระจายตัว แล้วจึงดูดมาวางบนสไลด์ หยดสีย้อม และปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ทำการประเมินผลของความสมบูรณ์ของเมล็ดกล้วยไม้ นำไปนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยแบ่งเป็น เมล็ดสมบูรณ์ และเมล็ดลีบ (ภาพที่ 14) แล้วนับจำนวนเมล็ดในแต่ละชนิด หาค่าเฉลี่ยความสมบูรณ์ของเมล็ด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 14 ลักษณะต่างๆ ของเมล็ดกล้วยไม้ที่ผสมติด ก) เมล็ดสมบูรณ์; ข) เมล็ดลีบ

การทดลองที่ 3 จำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลซิมบิเดียม

ศึกษาโครโมโซมจากเนื้อเยื่อปลายรากของกล้วยไม้สกุลซิมบิเดียมด้วยวิธี Feulgen's squash ที่ดัดแปลงโดยดวงทิพย์ (2539) และประภัสสร (2543)

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 ปลายรากของกล้วยไม้ซิมบิเดียม ยาวประมาณ 3-5 มิลลิเมตร

1.2 ขวดแก้วขนาดเล็กสำหรับเก็บตัวอย่างปลายราก

1.3 แผ่นสไลด์และแผ่นปิดสไลด์

1.4 อ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ

1.5 ปรอทวัดความร้อน (thermometer)

1.6 อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ มีดผ่าตัด ปากคีบ เข็มเขี่ย น้ำยาเคลือบเล็บ กระดาษทิชชู นาฬิกาจับเวลา

1.7 กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope และ photomicroscope

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับหยุดวงชีพเซลล์ (pre-treatment) ได้แก่ สารละลาย para-dichlorobenzene (PDB) คือ PDB 500 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร วางบนเครื่องทำความร้อนจนเกิดการหลอมเหลว และ 8-hydroxyquinoline (8-HQ)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยเตรียมสารละลายความเข้มข้น 0.002 โมลาร์ โดยชั่งสาร 8-HQ 0.029 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2.2 สารเคมีที่ใช้เตรียมน้ำยาในการรักษาสภาพเซลล์ (fixative) คือ 95 เปอร์เซ็นต์ของเอทธิลแอลกอฮอล์ และกรดอะซิติกเข้มข้น ในอัตราส่วน 3:1

2.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับย่อยแยกเซลล์ (hydrolytic solution) คือ กรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 1 นอร์มอล

2.4 สารเคมีที่ใช้ในการเก็บปลายรากที่ผ่านขั้นตอนการหยุดวงชีพเซลล์แต่ยังไม่ผ่านกรรมวิธีการย่อยแยกเซลล์ คือ 70 เปอร์เซ็นต์ของเอทธิลแอลกอฮอล์

2.5 สีที่ใช้ย้อมเนื้อเยื่อ ได้แก่ lacto-propionic orcein ซึ่งเตรียมเป็น stock solution โดยชั่ง orcein 2 กรัม ละลายในส่วนผสมของ lactic acid 50 มิลลิลิตร และ propionic acid 50 มิลลิลิตร โดยแช่ทิ้งไว้ค้างคืน แล้วจึงนำมากรอง ในการนำมาใช้ให้นำ stock solution มาเจือจางโดยใช้น้ำ ให้มีความเข้มข้นระหว่าง 45 ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ แล้วกรองอีกครั้งหนึ่ง แล้วบรรจุในขวดสีชาและเก็บไว้ในตู้เย็น

3. วิธีการทดลอง

3.1 เตรียมปลายราก โดยเลือกรากที่กำลังเจริญเติบโตซึ่งบริเวณปลายรากมีสีขาวขุ่น ใช้ปลายรากที่งอกใหม่และมีความยาวประมาณ 3-5 มิลลิเมตร ตัดเฉพาะส่วนปลาย 1-2 มิลลิเมตร เก็บตัวอย่างปลายรากในเวลา 8:00 9:00 10:00 11:00 และ 12:00 น.

3.2 นำปลายรากมาหยุดวงชีพเซลล์ โดยแช่ปลายรากในสารละลาย PDB และ 8-HQ เป็นเวลา 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

3.3 นำปลายรากออกมาจากสารละลาย PDB ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วนำไปแช่ด้วยน้ำยารักษาสภาพเซลล์นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 3 ครั้ง

3.4 ย่อยเซลล์ให้แยกออกจากกัน โดยการแช่รากในกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 1 นอร์มอล นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่นอีก 3 ครั้ง

3.5 ย้อมเนื้อเยื่อปลายรากในสีย้อม lacto-propionic orcein แช่ไว้นาน 30 นาที 1 และ 2 ชั่วโมง แล้วคีบเนื้อเยื่อวางบนแผ่นสไลด์ แล้วใช้มีดตัดเอาเฉพาะส่วนปลายรากยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร หยดสี 1 หยดบริเวณปลายราก ใช้เข็มเขี่ยเคาะเนื้อเยื่อเบาๆ เพื่อให้เซลล์กระจาย คีบเนื้อเยื่อส่วนเกินทิ้ง แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ วางกระดาษซับบนแผ่นสไลด์ และกดด้วยนิ้วหัวแม่มือลงเพื่อให้เซลล์กระจาย พร้อม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กับซับสีส่วนเกินออก และเคาะด้วยปลายด้ามดินสอเบาๆ เพื่อไล่ฟองอากาศออกจนหมด

3.6 นำแผ่นสไลด์ไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมตาเฟส และมีการกระจายตัวของโครโมโซมดีมากกว่า 10 เซลล์ สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้แม่นยำ เมื่อได้เซลล์ที่ต้องการแล้วกดแผ่นสไลด์เบาๆ เพื่อให้เซลล์แบนราบ และอยู่ในระนาบเดียวกัน ใช้น้ำยาเคลือบเล็บทาตามขอบของกระจกปิดสไลด์เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์แห้ง นำแผ่นสไลด์ไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อนับจำนวนโครโมโซมและบันทึกภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved