# บทที่ 3

## อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาความสามารถในการผสมข้ามหมู่ของกล้วยไม้สกุลหวายของไทยและหวายพันธุ์การค้า แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 การผสมพันธุ์และการติดฝัก การทดลองที่ 2 จำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลหวาย

### การทดลองที่ 1 การผสมพันธุ์และการติดฝัก

การทดลองนี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง การทดลองย่อยแต่ละการทดลองมีอุปกรณ์และวิธีการดังต่อไปนี้

#### การทดลองที่ 1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และช่วงเวลาการออกดอก

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานของส่วนประกอบของต้นพืช ได้แก่ ราก ลำต้น ใบ และดอก และช่วงเวลาการออกดอกโดยบันทึกข้อมูลดังกล่าวจากต้นพืชทดลอง 5 ต้น ในระยะที่ส่วนต่างๆ ของต้นเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว

**1.1.1 วัสดุและอุปกรณ์**

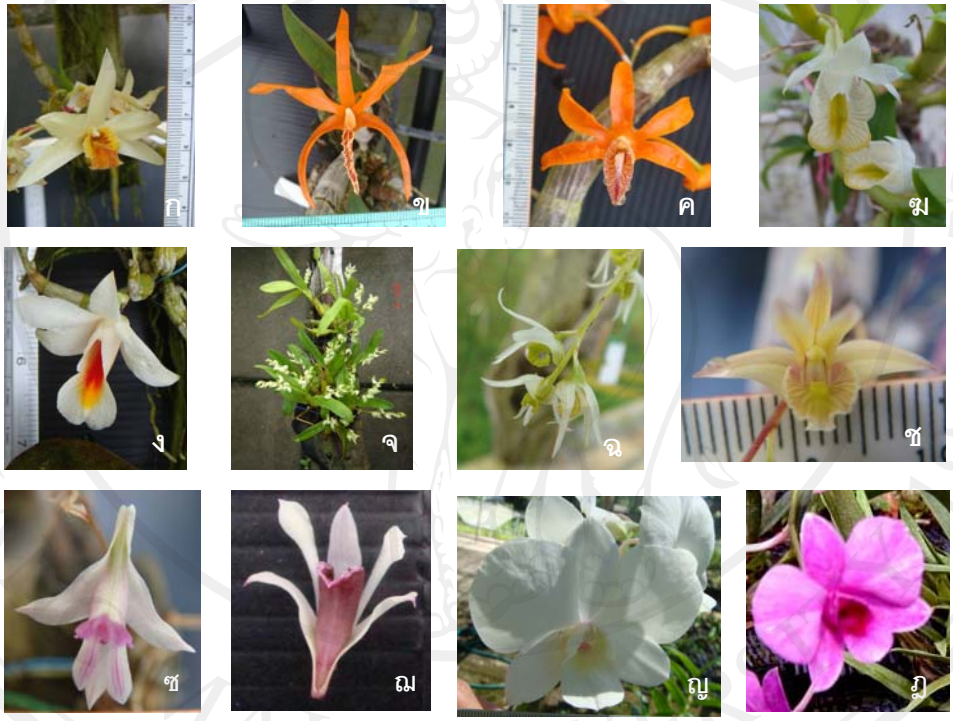
1.1.1.1 พืชทดลอง

กล้วยไม้หวาย ทั้งหมด 4 หมู่ ได้แก่ *Dendrobium Distichophyllum* Hk. f. *Formosae* (Benth. & Hk. f.) Hk. f. *Stachyobium* Lindl. และกลุ่มหวายลูกผสม จำนวน 10 ชนิดและ 2 สายพันธุ์ ดังนี้คือ

- หมู่ *Dendrobium* ได้แก่ เอื้องสีตาล (*Dendrobium heterocarpum* Lindl.) ครั่งแสดน้อย (*D. lanyaiae* Seidenf.) และครั่งแสด (*D. unicum* Seidenf.)
- หมู่ *Distichophyllum* Hk. f. ได้แก่ เอื้องข้าวตอกใต้ (*D. trinervium* Ridl.)
- หมู่ *Formosae* (Benth. & Hk. f.) Hk. f. ได้แก่ เอื้องแซะดอยปุย (*D. christyanum* Rchb. f.)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- หมู่ *Stachyobium* Lindl. ได้แก่ เอื้องข้าวตอก (*D. compactum* Rolfe ex W. Hackett.) *D. pychnostachyum* Lindl. *D. gregulus* Seidenf. *D. microbulbon* A. Rich. และเอื้องนางลม (*D. peguanum* Lindl.)
- กลุ่มหวายลูกผสม ได้แก่ ลูกผสมฟอร์มกลมดอกสีขาว และลูกผสมฟอร์มกลมดอกสีม่วง (ภาพที่ 2)




**ภาพที่ 2** กล้วยไม้สกุลหวาย 10 ชนิดและ 2 สายพันธุ์

ก) *D. heterocarpum* Lindl.; ข) *D. lanyaiae* Seidenf.; ค) *D. unicum* Seidenf.; ฆ) *D. trinervium* Ridl.; ง) *D. christyanum* Rchb. f.; จ) *D. compactum* Rolfe ex W. Hackett.; ฉ) *pychnostachyum* Lindl.; ช) *D. gregulus* Seidenf.; ซ) *D. microbulbon* A. Rich.; ฌ) *D. peguanum* Lindl.; ญ) *D.* hybrid (white flower); ฎ) *D.* hybrid (purple flower)

1.1.1.2 อุปกรณ์ ได้แก่ ไม้บรรทัด เวอร์เนียคาริปเปอร์ สมุด ปากกา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**1.1.2 วิธีการ**

1.1.2.1 บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของส่วนประกอบของต้นพืชทดลองได้แก่ ราก ลำต้น ใบ และดอก ในระยะที่ส่วนต่างๆ ของต้นเจริญเติบโตเต็มที่โดยบันทึกลักษณะจากตัวอย่าง 5 ต้น และบันทึกช่วงเวลาที่พืชทดลองออกดอก

1.1.2.2 บันทึกจำนวนและขนาดของส่วนประกอบของต้นดังนี้

1.1.2.2.1 **ราก** บันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของราก

1.1.2.2.2 **ลำต้น** เส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้น ความยาวของลำต้นจากโคนถึงยอด ความยาวข้อปล้อง

1.1.2.2.3 **ใบ** รูปร่างใบ จำนวนใบต่อต้น ความกว้างและความยาวใบ โดยวัดขนาดของใบที่ 3 นับจากโคนต้น

1.1.2.2.4 **ดอก** จำนวนดอกต่อช่อ เส้นผ่านศูนย์กลางดอกบาน ความกว้างและความยาวดอก ความกว้างและความยาวของกลีบเลี้ยงและกลีบดอก สีของกลีบดอก

1.1.2.2.5 **ช่วงเวลาการออกดอก** บันทึกช่วงเวลาและจำนวนดอกที่พืชทดลองออกดอกในรอบปี

**การทดลองที่ 1.2 การผสมตัวเองและการผสมข้ามหมู่และชนิด**

ศึกษาความเข้ากันได้ของกล้วยไม้สกุลหวาย 10 ชนิด และ 2 สายพันธุ์

**1.2.1 วัสดุและอุปกรณ์**

1.2.1.1 พืชทดลอง ได้แก่ กล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 10 ชนิด และ 2 สายพันธุ์

1.2.1.2 วัสดุที่ใช้ ได้แก่ ไม้จิ้มฟัน ถุงซิป แผ่นป้ายแขวนพลาสติก ดินสอ เส้นด้าย สมุดบันทึก และกล้องถ่ายภาพดิจิตอล

**1.2.2 วิธีการทดลอง**

1.2.2.1 การผสมเกสร

คัดเลือกต้นพ่อ-แม่พันธุ์ที่มีลักษณะที่ดี สมบูรณ์แข็งแรง ไม่มีโรคและแมลง ดอกมีสีสันสวยงาม ทำการผสมเกสรแบบพบกันหมดและสลับพ่อ-แม่ ผสมช่วงเวลา 8:30-9:30 น. โดยใช้ไม้ปลายแหลมที่สะอาดเขี่ยกลุ่มเรณูออกมา แล้วนำไปใส่ยอดเกสรเพศเมียซึ่งเป็นแอ่งที่มีน้ำเมือกเหนียว ใสคล้ายแป้งเปียก แล้วติดป้ายบันทึกคู่ผสมและวันที่ทำการผสม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.2.2 การบันทึกข้อมูล

บันทึกคู่ผสมที่ผสมติด วันที่ผสม และจำนวนดอกที่ผสมติด

**การทดลองที่ 2 จำนวนโครโมโซม**

ศึกษาโครโมโซมจากเนื้อเยื่อปลายรากของพืชทดลองด้วยวิธี feulgen's squash ที่ดัดแปลงโดยดวงทิพย์ (2539) และประภัสสร (2543)

**2.1 วัสดุและอุปกรณ์**

2.1.1 ปลายรากของพืชทดลอง

2.1.2 ขวดแก้วขนาดเล็กสำหรับเก็บตัวอย่างปลายราก

2.1.3 แผ่นกระจกสไลด์และแผ่นปิดสไลด์

2.1.4 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

2.1.5 เทอร์โมมิเตอร์

2.1.6 วัสดุอื่นๆ ได้แก่ กรรไกร ปากคีบ เข็มเขี่ย น้ำยาเคลือบเล็บ กระดาษทิชชู นาฬิกาจับเวลา หลอดหยด กระติกน้ำแข็ง หลอดดูดสาร

2.1.7 กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope และ photomicroscope

2.1.8 สารเคมี

2.1.8.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับหยุดวงชีพเซลล์ (pre-treatment) ได้แก่ para-dichlorobenzene และ 8-hydroxyquinoline

2.1.8.2 สารเคมีที่ใช้เตรียมสารเคมีในการรักษาสภาพเซลล์ (fixative) คือ 95% ethyl alcohol และ glacial acetic acid ในอัตราส่วน 3:1

2.1.8.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับย่อยแยกเซลล์ (hydrolytic solution) คือ 1 N HCl

2.1.8.4 สีที่ใช้ย้อม ได้แก่ lacto-propionic orcein และ carbon fuchsin

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**2.2 วิธีการทดลอง**

2.2.1 เตรียมปลายราก โดยเลือกรากที่งอกใหม่ที่กำลังเจริญเติบโตซึ่งบริเวณปลายรากมีสีขาวขุ่น และมีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ตัดมาเฉพาะส่วนปลายเพียง 1-2 มิลลิเมตร เก็บตัวอย่างปลายรากในช่วงเวลา 8:00 9:00 10:00 และ 11:00 น.

2.2.2 หยุดวงชีพเซลล์ โดยแช่ปลายรากในสารละลาย pre-treatment ได้แก่ para-dichlorobenzene หรือ 8-hydroxyquinoline เป็นเวลา 3 4 5 6 และ 7 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

2.2.3 นำปลายรากออกมาจากสารละลาย pre-treatment ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วนำไปแช่ด้วยน้ำยารักษาสภาพเซลล์นาน 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 3 ครั้ง

2.2.4 ย่อยเซลล์ให้แยกออกจากกัน โดยแช่รากใน 1 N HCl นาน 5 นาทีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่นอีก 3 ครั้ง

2.2.5 ย้อมเนื้อเยื่อปลายรากในสีย้อม lacto-propionic orcein หรือ carbon fuchsin แช่ไว้นาน 1 และ 2 ชั่วโมง แล้วคีบเนื้อเยื่อวางบนแผ่นสไลด์ แล้วใช้มีดตัดเอาเฉพาะส่วนปลายรากยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร เขี่ยส่วนเกินทิ้งไป หยดสีลงไปอีก 1 หยดบริเวณปลายราก ใช้เข็มเขี่ยเคาะเนื้อเยื่อเบาๆ เพื่อให้เซลล์กระจาย คีบเนื้อเยื่อส่วนเกินทิ้ง แล้วปิดแผ่นกระจกปิดสไลด์บนบริเวณที่มีเนื้อเยื่อ วางกระดาษซับบนแผ่นสไลด์เพื่อซับสีที่มากเกินไปออก และกดด้วยนิ้วหัวแม่มือลงไปเพื่อให้เซลล์กระจาย และเคาะด้วยปลายด้ามดินสอเบาๆ เพื่อไล่ฟองอากาศออกจนหมด

2.2.6 นำแผ่นกระจกสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมตาเฟส และมีการกระจายตัวของโครโมโซมดี สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้แม่นยำ เมื่อได้เซลล์ที่ต้องการแล้วกดแผ่นกระจกสไลด์เบาๆ เพื่อให้เซลล์แบนราบและอยู่ในระนาบเดียวกัน ใช้น้ำยาเคลือบเล็บทาตามขอบของกระจกปิดสไลด์เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์แห้ง นำแผ่นสไลด์ไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อนับจำนวนโครโมโซม โดยนับโครโมโซมจำนวน 5 เซลล์ต่อปลายราก และบันทึกภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved