บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการศึกษา

วัสดุอุปกรณ์

1. พืชทดลอง
   - 1.1 เหง้าคองดึง (*G. superba* Linn.) จำนวน 100 เหง้า
   - 1.2 ช่อดอกกลอริโอซ่า (*G. rothschildiana* O'Brien.)
   - 1.3 clean culture ของ *G. rothschildiana* O'Brien.
2. วัสดุอุปกรณ์ทางการเกษตร
   - 2.1 ดินผสมสำหรับปลูกพืช
   - 2.2 ปุ๋ยคอกและปุ๋ยอินทรีย์
   - 2.3 ปุ๋ยเคมี สูตร 16-16-16
   - 2.4 ไม้ไผ่และเชือกเอ็นสำหรับทำค้าง
3. อุปกรณ์สำหรับศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา
   - 3.1 เวอร์เนียร์
   - 3.2 ไม้บรรทัด
   - 3.3 ตารางเทียบสี ND color ของบริษัท สยามแกรฟฟิคเอเยนซี่ จำกัด
4. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับศึกษาการงอกของละอองเกสร
   - 4.1 น้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์
   - 4.2 สไลด์หลุมและกระจกปิดสไลด์
   - 4.3 จานแก้ว
   - 4.4 กล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope
5. อุปกรณ์สำหรับผสมเกสร
   - 5.1 กรรไกรปลายแหลม

5.2 ถุงกระดาษและคลิบหนีบกระดาษ

5.3 ป้ายกระดาษสำหรับบันทึกวันที่ผสมเกสร

5.4 จานแก้ว และพู่กันขนอ่อน

6. อุปกรณ์และสารเคมีในการศึกษาการงอกของ pollen tube บน stigma และใน style

6.1 Carnoy's solution

6.2 แผ่นสไลด์และกระจกปิดสไลด์

6.3 สี propiono-carmine 2 %

6.4 กล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope

7. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

7.1 อุปกรณ์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น ขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ, หม้อนึ่งความดัน ตู้อบเครื่องแก้ว, ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ, เครื่องแก้ว, มีดผ่าตัด, คีมคีบปลายแหลม และ ฯลฯ

7.2 สารเคมีในการเตรียมอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962) (ภาคผนวก ก)

7.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

7.3.1 Napthalene Acetic Acid (NAA)

7.3.2 6-Benzyl Amino Purine (BAP)

7.4 สารเคมีสำหรับฆ่าเชื้อ

7.4.1 Ethyl Alcohol

7.4.2 Chlorox และ Tween 20

7.5 สารเคมีสำหรับปรับ pH

7.5.1 Hydrochloric acide (HCl) 1 normal

7.5.2 Sodium hydroxide (NaOH) 1 normal

8. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับศึกษาโครโมโซม

8.1 alphabromonapthalene

8.2 acetic acid

8.3 Ethyl Alcohol

8.4 1 N HCl

8.5 สีย้อม Schiff's reagent และ propiono-carmine 2%

8.6 อ่างควบคุมอุณหภูมิ

8.7 แผ่นสไลด์ และกระจกปิดสไลด์

8.8 ดินสอที่มียางลบและเข็มเขี่ย

8.9 กล้องจุลทรรศน์ แบบ light microscope

9. อุปกรณ์สำหรับบันทึกภาพ

9.1 กล้องถ่ายภาพและเลนส์สำหรับถ่ายภาพวัตถุระยะใกล้

9.2 กล้องถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ (Olympus BH-2)

9.3 ฟิลม์สี, ฟิลม์ขาวดำและฟิลม์สไลด์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการศึกษา

1 การผสมพันธุ์ข้ามชนิดระหว่างดองดึง*G. superba* Linn. และ*G. rothschildiana* O'Brien.

1.1 การเตรียมพืชทดลอง

1.1.1 ปลูกดองดึงเพื่อใช้เป็นพันธุ์แม่ในการผสมพันธุ์ โดยเตรียมแปลงขนาด 1x5 เมตร พลิกหน้าดินตากแดดนาน 7 วัน ใส่ดินผสม ผสมปุ๋ยคอกและปุ๋ยอินทรีย์ลงในดินแล้วขึ้นแปลงสูงประมาณ 10 เซนติเมตร ปลูกเหง้าดองดึงที่เริ่มแตกยอดระยะ 25x25 เซนติเมตร จำนวน 100 เหง้า รดน้ำให้ชุ่มทำค้างไม้ไผ่และผูกเชือกเอ็นเพื่อเป็นที่ยึดเกาะของใบและพยุงลำต้น ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 16-16-16 ทุก 1 เดือน กำจัดวัชพืชและศัตรูพืชอย่างสม่ำเสมอ ระหว่างนี้ดำเนินการศึกษาตามข้อ 1.2 , 1.3 และ 1.5

1.1.2 นำช่อดอก *G. rothschildiana* O'Brien. ที่สั่งซื้อจากประเทศฮอลแลนด์ มาแช่โดนช่อดอกในน้ำและเก็บในห้องอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส เพื่อนำละอองเกสรมาใช้ผสมกับดอกดองดึงในแปลงทดลองที่ปลูกไว้ ละอองเกสรที่ใช้ในการผสมมาจากอับละอองเกสรที่เพิ่งแตกใหม่ ๆ ส่วนที่เหลือจากการผสมเกสรแต่ละครั้งจะเก็บไว้ในจานแก้วที่ปิดฝาวางไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 10-15 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ผสมเกสรในวันต่อ ๆ ไปได้โดยมีการทดสอบการงอกของละอองเกสรก่อนการผสม

1.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *G. superba* Linn. เปรียบเทียบกับ *G. rothschildiana* O'Brien.

ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดองดึงที่ปลูกในแปลงทดลองกับช่อดอกของ *G. rothschildiana* O' Brien.จากประเทศฮอลแลนด์ โดยการสังเกต วัดขนาดและบันทึกลักษณะต่อไปนี้โดยแต่ละส่วนใช้จำนวนตัวอย่าง 10 ตัวอย่าง แล้วนำค่าที่วัดได้มาหาค่าเฉลี่ย ส่วนการบันทึกสีใช้วิธีเทียบกับตารางเทียบสี ND color

- ลำต้น ศึกษาลักษณะสีของลำต้น และวัดความยาวของปล้อง

- ใบ ศึกษาการติดของใบบนลำต้น ลักษณะของใบ สีของใบ และวัดขนาดของใบโดยวัดใบที่ 1 , 2 และ 3 นับจากดอกล่างสุด

- ดอก ศึกษาลักษณะของดอก สีของกลีบดอก วัดขนาดของกลีบดอก วัดความยาวก้านดอก วัดขนาดของอับละอองเกสร วัดความยาวของก้านอับละอองเกสร วัดขนาดของรังไข่ วัดความยาวของก้านเกสรตัวเมีย

1.3 การหาเปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien.

ก่อนการผสมเกสรในแต่ละวันนำละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien. มาทดสอบหาเปอร์เซ็นต์การงอก โดยการเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ บนสไลด์หลุมที่เก็บไว้ในจานแก้วที่เติมน้ำเพื่อรักษาความชื้นที่อุณหภูมิห้องนาน 1-2 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจนับจำนวนละอองเกสรที่งอกและไม่งอกหลอดละอองเกสร ใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย X10 นับจำนวนละอองเกสรสไลด์ละ 5 ตำแหน่งที่ไม่ซ้ำกันแล้วนำค่าที่นับได้มาหาค่าเฉลี่ยและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเกสร

1.4 การผสมเกสรด้วยมือ (hand pollination)

1.4.1 การผสมเกสรดองดึงด้วยละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien.

1.4.1.1 กำจัดเกสรตัวผู้ (emusculation) ของดอกดองดึงที่ใช้เป็นต้นแม่ในระยะก่อนดอกบาน 2 วันในช่วง 16.00-17.00 น. แล้วครอบดอกด้วยถุงกระดาษเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของละอองเกสรที่ไม่ต้องการ

1.4.1.2 ผสมเกสร (pollination) ในระยะก่อนดอกบาน 1 วัน ในช่วงเวลา 8.00-12.00 โดยการใช้พู่กันขนอ่อนแตะละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien. จากอับละอองเกสรที่เพิ่งแตกใหม่หรือละอองเกสรที่เก็บรวบรวมไว้ แล้วนำไปแตะตรงปลายของยอดเกสรตัวเมียของดอกดองดึงที่กำจัดเกสรตัวผู้ไว้แล้ว และครอบด้วยถุงกระดาษอีกครั้งเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของละอองเกสรที่ไม่ต้องการ โดยผสมเกสรทั้งหมดจำนวนประมาณ 300 ดอก

1.4.1.3 ผูกป้ายแสดงวันที่ทำการผสมเกสรไว้ที่ดอก

1.4.1.4บันทึกผลโดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของขนาดรังไข่และออวุลหลังทำการผสมเกสร 6, 8, 10, 12 และ 14 วัน เปรียบเทียบกับดอกดองดึงที่ไม่ได้รับการผสมเกสร

1.4.2 การผสมเกสรดองดึงด้วยละอองเกสรดองดึง ผสมเกสรด้วยมือตามขั้นตอน 1.4.1.1–1.4.1.4 เช่นกัน แต่ใช้ละอองเกสรของดองดึงแทนละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการเจริญและพัฒนาของรังไข่และออวุลที่อายุเท่า ๆ กัน โดยผสมเกสรทั้งหมดจำนวนประมาณ 150 ดอก

1.5 การศึกษาการงอกของหลอดละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien. บนยอดเกสรตัวเมียและในก้านเกสรตัวเมียของดอกดองดึง

นำยอดเกสรตัวเมียและก้านเกสรตัวเมียของดอกดองดึงที่ได้รับการผสมเกสรด้วยละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien. มาแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไปแช่ในสารละลาย Carnoy's solution นาน 1 ชั่วโมง เพื่อทำให้เนื้อเยื่ออ่อนนุ่ม วางตัวอย่างที่เตรียมไว้ดังกล่าวบนแผ่นสไลด์แล้วหยดด้วยสี propiono-carmine 2 เปอร์เซนต์ 1-2 หยด ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ กดกระจกให้แบนราบ แล้วนำสไลด์ไปตรวจดูการงอกของหลอดละอองเกสร ใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope ด้วย objective X10 และ X100

2. การเลี้ยงออวุลของดองดึงที่ผสมด้วยละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien. และออวุลของดองดึงที่ผสมด้วยละอองเกสรของดองดึง

นำรังไข่จากดอกดองดึงที่ได้รับการผสมด้วยละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien. และละอองเกสรของดองดึงที่มีอายุหลังผสมเกสรแล้ว 6 8 และ 10 วัน จากข้อ 1.4.1 และ 1.4.2 มาฆ่าเชื้อที่ผิวเพื่อนำออวุลภายในมาเลี้ยงในหลอดทดลอง

2.1 การศึกษาเทคนิคการฆ่าเชื้อที่ผิวเพื่อลดการปนเปื้อน (contamination) ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับรังไข่ของดองดึง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อหาวิธีฆ่าเชื้อที่ผิวรังไข่ของดองดึงเพื่อนำออวุลออกมาเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อในหลอดทดลอง โดยใช้รังไข่ของดองดึงที่ปล่อยให้มีการผสมเปิดมาศึกษาเปรียบเทียบผลของเทคนิคการฆ่าเชื้อที่ผิวรังไข่ของดองดึง 4 วิธี คือ

วิธีที่ 1 แช่รังไข่ใน 95% ethyl alcohol เขย่านาน 1 นาที จากนั้นย้ายรังไข่ไปแช่ใน 25% chlorox เขย่านาน 20 นาที

วิธีที่ 2 แช่รังไข่ใน 95% ethyl alcohol เขย่านาน 1 นาที จากนั้นย้ายรังไข่ไปแช่ใน 50% chlorox เขย่านาน 20 นาที

วิธีที่ 3 ใช้ปากคีบคีบรังไข่จุ่มใน 95% ethyl alcohol จนมิดแล้วนำขึ้นมาผ่านเปลวไฟ

วิธีที่ 4 แช่รังไข่ใน 95% ethyl alcohol เขย่านาน 1 นาที แล้วแยกรังไข่ออกจากกันตามแนวผนังกั้นห้องรังไข่ ซึ่งมี 3 ห้องนำมาแช่ใน 25% chlorox เขย่านาน 20 นาที

จากนั้นใช้ปากคีบปลอดเชื้อคีบรังไข่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วทั้ง 4 วิธี มาวางบนจานแก้วที่อบฆ่าเชื้อแล้วนำเข้าตู้ถ่ายเนื้อเยื่อเพื่อตัดแยกเอาเฉพาะออวุลไปเลี้ยงในหลอดทดลองในสภาพปลอดเชื้อ ใน Induction medium I-1 MS + 5% sucrose + 0.1 mg/l NAA และบันทึกการปนเปื้อนที่เกิดขึ้นหลังการเลี้ยงออวุล นาน 7 วัน ทำการทดลองฆ่าเชื้อที่ผิวรังไข่ตามวิธีทั้ง 4 วิธีละ 20 ขวด

2.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงออวุลของดองดึงที่ผสมด้วยละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien. และออวุลของดองดึงที่ผสมตัวเอง

2.2.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำการเจริญของออวุลของดองดึงที่ผสมด้วยละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien. และออวุลของดองดึงที่ผสมตัวเอง

โดยทดลองใช้สูตรอาหารของ Murashige and Skoog (1962) หรือ MS ดังแปลงโดยเติมน้ำตาลซูโครสและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซิน เป็น Induction medium เปรียบเทียบกันจำนวน 3 สูตรดังนี้

สูตร I-1 MS + 5% sucrose + 0.1 mg/l NAA

สูตร I-2 MS + 5% sucrose + 0.5 mg/l NAA

สูตร I-3 MS + 5% sucrose + 1.0 mg/l NAA

นำออวุลจากรังไข่ที่ sterilize รังไข่แล้วโดยวิธีที่ 1 จากข้อ 2.1 อายุหลังการผสมเกสร 6, 8, และ 10 วัน จำนวนอย่างละ 50 รังไข่ แต่ละรังไข่จะแบ่งออวุลไปเลี้ยงในอาหาร 3 สูตร สูตรละ 150 ขวด แต่ละสูตรแบ่งเป็นสองกลุ่ม กลุ่มที่หนึ่งเลี้ยงออวุลในสภาพที่ไม่มีแสงและกลุ่มที่สองเลี้ยงออวุลในสภาพที่มีแสงนาน 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1,000 lux ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 25 องศาเซลเซียส สังเกตผลและบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงลักษณะของสีและขนาดของออวุลทุกๆ 1สัปดาห์ ทำการทดลองเช่นเดียวกันทั้งออวุลของดองดึงที่ผสมด้วยละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien. และออวุลของดองดึงที่ผสมตัวเอง

2.2.2 การศึกษาสูตรอาหารเพื่อเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เจริญจากออวุลให้พัฒนาเป็นต้นพืช

ย้ายเนื้อเยื่อที่เจริญได้จากออวุลมาเลี้ยงใน Regeneratiom medium 4 สูตร เพื่อศึกษาเปรียบเทียบกันได้แก่

สูตร R-1 MS + 3% sucrose + 0.1 mg/l NAA + 1.0 mg/l BAP

สูตร R-2 MS + 3% sucrose + 0.1 mg/l NAA + 4.0 mg/l BAP

สูตร R-3 MS + 3% sucrose + 0.5 mg/l NAA + 4.0 mg/l BAP

สูตร R-4 MS + 3% sucrose + 1.0 mg/l NAA + 4.0 mg/l BAP

และศึกษาเปรียบเทียบกับการย้ายเนื้อเยื่อมาเลี้ยงใน Induction medium (I-1) ด้วยสภาพที่เลี้ยงให้แสง 1,000 lux 16 ชั่วโมง/วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

2.2.3 การเพิ่มจำนวนยอดของต้นดองดึงถูกผสมและดองดึงผสมตัวเองจากการเลี้ยงออวุล

นำยอดที่เกิดขึ้นในหลอดทดลองทั้งของดองดึงถูกผสมและดองดึงผสมตัวเอง ย้ายมาเพิ่มจำนวนใน Multiplication medium หรือสูตร MM คือ MS + 3% sucrose + 4.0 mg/l BAP อย่างละ 10 ขวด

2.2.4 การชักนำให้เกิดรากในหลอดทดลองของยอดดองดึงถูกผสม ดองดึงผสมตัวเอง และ *G. rothschildiana* O'Brien.

นำยอดดองดึงถูกผสมและดองดึงผสมตัวเองที่เตรียมเพิ่มจำนวนไว้ในขั้นตอนที่ 2.2.3 รวมทั้งยอดของ *G. rothschildiana* O'Brien.ใน clean culture (อมรรัตน์, 2540) มาเลี้ยงใน

Regeneratiom medium สูตร R-2 MS + 3% sucrose + 0.1 mg/l NAA + 4.0 mg/l BAP , สูตร R-3 MS + 3% sucrose + 0.5 mg/l NAA + 4.0 mg/l BAP และสูตร R-4 MS + 3% sucrose + 1.0 mg/l NAA + 4.0 mg/l BAP สูตรละ 10 ขวด

3. การศึกษาจำนวนโครโมโซมของดองดึง *G. superba* Linn., *G. rothschildiana* O'Brien. และพืชลูกผสมระหว่างพืช 2 ชนิด

การศึกษาจำนวนโครโมโซมโดยวิธีการเตรียมเซลล์แบบ Feulgen-squash

3.1 การหยุดวงชีพของเซลล์ (pretreatment) โดยการตัดปลายรากของพืชที่เลี้ยงในหลอดทดลองที่เตรียมไว้ในขั้นตอนข้อที่ 2.2.4 ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร แช่ในสารละลายอิ่มตัวของ alphabromonapthalene แล้วนำไปเก็บในที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 16, 20, และ 24 ชั่วโมง

3.2 หยุดการทำงานของเซลล์ (fixation) นำปลายรากไปแช่ใน fixative คือ กรดแอซีติก 90 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

3.3 การเก็บรักษาเนื้อเยื่อ (storage) นำปลายรากของพืชไปล้างกรดแอซีติกออกด้วย ethyl alcohol 70 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเก็บรากของพืชไว้ใช้ได้นาน 6-12 เดือน ใน ethyl alcohol 70 เปอร์เซ็นต์ โดยเซลล์ไม่สูญเสียน้ำ

3.4 การแยกเซลล์ (hydrolysis) นำปลายรากของพืชมา hydrolyze ด้วย 1 N HCl ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 8-12 นาที

3.5 การย้อมสีโครโมโซม (staining)นำปลายรากของพืชไปแช่ใน Schiff's reagent นาน 1 ชั่วโมง จนเกิดสีม่วงแดง

3.6 การเตาะโครโมโซม นำปลายรากของที่ติดสีม่วงแแดงไปวางในน้ำแล้วตัดเฉพาะส่วนที่ติดสีแดงเข้มวางบนสไลด์แล้วหยดสี propiono-carmine 2 เปอร์เซ็นต์ 1-2 หยด ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ตรงบริเวณที่มีสีแดง แล้วใช้ปลายดินสอด้านที่มียางลบเรียบ ๆ ค่อย ๆ เคาะตรงบริเวณที่มีเนื้อเยื่อสีแดงให้เซลล์กระจายแยกออกจากกันจนไม่เห็นกลุ่มเซลล์ที่ติดสีแดง นำสไลด์ไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย x10 เลือกหาเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมทาเฟสแล้วนำสไลด์มาเคาะอีกครั้ง เพื่อให้โครโมโซมกระจายดีขึ้นจึงนำกระดาษซับวางบนแผ่น

กระจกปิดสไลด์ใช้หัวแม่มือกดเพื่อให้โครโมโซมอยู่ในระนาบเดียวกัน นำสไลด์ไปตรวจอีกครั้ง เลือกเซลล์ที่มีโครโมโซมกระจายดีสวยที่สุดมาตรวจนับจำนวนโครโมโซมจำนวนอย่างน้อยจำนวน 10 เซลล์ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย x100 และถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ Olympus BH 2 โดยใช้ฟิล์มขาวดำ T-Max 100

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย