# บทที่ 2
# อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

## อุปกรณ์

วัสดุที่ใช้ กล้วยไม้ที่นำมาทดลองได้จาก รองศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย เป็นลูกผสม 6 พันธุ์ รวม 9 cultivar พันธุ์ที่ซ้ำกัน คือ D. Caesar 3 cultivar D. superbiens 2 cultivar พวกหนึ่งเป็นลูกผสมที่เกิดจากเมล็ดใหม่ ๆ และอีกพวกหนึ่งจากต้นที่เจริญมาจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ ลูกผสมที่นำมาทดลองส่วนใหญ่เป็น diploid ยกเว้น Dendrobium Desaputra และ D. Caesar เลขที่ 1 เป็น triploid และ D. Majestic เป็น pentaploid พวกที่มาจากเมล็ดคือ D. Lim Chong Min. x D. formosum และ ⊗ D. May Neal ส่วนที่เหลือทำจากเนื้อเยื่อที่เจริญแล้ว ส่วนใหญ่จากรองศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย มีบางชนิดที่ผู้เขียนทำเอง

กล้วยไม้ที่นำมาทดลองได้จัดแบ่งเป็นหมู่ คือ primary hybrid secondary hybrid และ complex hybrid, primary hybrid ได้จากการผสมของ 2 species จาก 2 section secondary hybrid ได้จากการผสมมากกว่า 2 species ขึ้นไป แต่มาจาก 2 section เท่านั้น ส่วน complex hybrid ได้จากการผสมมากกว่า 2 species และมากกว่า 2 section ขึ้นไป ดังแสดงในตารางที่ 3 (Sander and Wreford 1961, Holttum 1953)

## สารเคมีที่ใช้

1. $\alpha$ - Bromonaphthalene (Reagent grade)

008672

ตารางที่ 3 รายชื่อกล้วยไม้ที่นำมาทดลอง ชื่อ พ่อ แม่ section พ่อและแม่

| ชื่อ | แม่ x พ่อ | section แม่ x พ่อ | หมายเหตุ |
|---|---|---|---|
| Primary hybrid<br>D. Caesar เลขที่ 1 (2n=57) | D. phalaenopsis x D. stratiotes | Phalaenanthe x Ceratobium | ดอกใหญ่ สีขาว |
| D. Caesar เลขที่ 2 (2n=38) | " | " | ดอกใหญ่ สีม่วง |
| D. Caesar เลขที่ 3 (2n=38) | " | " | ดอกเล็ก สีม่วง |
| D. superbiens เลขที่ 1 (2n=38) | D. phalaenopsis x D. discolor | " | ดอกสีม่วง ชมพู natural hybrid |
| D. superbiens เลขที่ 2 (2n=38) | " | " | ดอกสีม่วง น้ำเงิน natural hybrid |
| D. Desaputra (2n=57) | D. veratrifolium x D. pulchellum | Ceratobium x Eugenanthe | รศ.ดร. ถาวร วัชราภัย เป็นผู้ผสม |
| Secondary hybrid<br>D. May Neal (2n=38) | D. May Neal* | Phalaenanthe x Ceratobium } Ceratobium | รศ.ดร. ถาวร วัชราภัย เป็นผู้ผสม |
| Complex Hybrid<br>D. Majestic (2n=95) | D. Caesar* x D. pulchellum | Phalaenanthe x Ceratobium } Eugenanthe | |
| Unnamed hybrid (2n=38) | D. LimChong Min.* x D. formosum | Phalaenanthe x Ceratobium } Nigrohirsutae | |

* อ่านรายละเอียดในภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. Acetic acid carmine วิธีเตรียมสีใช้ carmine 10 กรัม ต่อ acetic acid 45 เปอร์เซ็นต์ 1 ลิตร นำมาอุ่นแต่ไม่ให้เดือด ประมาณ 5 นาที ตั้งทิ้งไว้แล้วกรอง (Conn, Darrow and Emmel, 1965)

3. สารละลายโคลชิซีน ความเข้มข้น 0.2 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำกลั่นอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ความดัน 1 กิโลกรัมต่อหนึ่งตารางเซ็นติเมตร เวลา 15 นาที

4. Schiff's reagent เตรียมตามวิธีของ Darlington & La Cour (1962) และAcetoorcein 2 เปอร์เซ็นต์

5. อาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อ เตรียมจากวิธีของ M. and T. Vajrabhaya (1970) แต่ไม่ใส่ glycine

การทดลอง

วิธีเลี้ยงเนื้อเยื่อ เลี้ยงเมล็ดและเนื้อเยื่อเจริญ (meristem) ของกล้วยไม้ในวุ้นตามวิธีของ Morel (1965), Sagawa, Shoji and Shoji (1966) และ Vajrabhaya and Vajrabhaya (1970) วุ้นอาหารที่ใช้เตรียมตามวิธีของ Vajrabhaya and Vajrabhaya (1970) โดยเลี้ยงในห้องที่มีอุณหภูมิ 27 $\pm$ 2°C ให้แสงวันละ 14 ชั่วโมง ด้วยไฟฟลูออเรสเซนส์ day light และสีขาวอย่างละหลอดที่มีความเข้มของแสงประมาณ 2000 – 3000 lux เมื่อเมล็ดและเนื้อเยื่อเจริญ (meristem) เจริญเป็น callus protocorm like body และต้นอ่อนมากพอกับความต้องการ ก่อนที่จะนำมาแช่ในสารละลายโคลชิซีนเปลี่ยนวุ้นอาหารใหม่ เพื่อให้เซลมีการแบ่งตัวมาก ๆ หลังจากนี้ 2 – 3 สัปดาห์ ก็นำ callus protocorm like body และต้นอ่อนมาแช่ในสารละลายโคลชิซีน

การใช้สารโคลชิซีนชักนำให้เกิด polyploid ใน callus , protocorm like body และต้นอ่อน

นำ callus , protocorm like body และต้นอ่อนของลูกผสม Dendrobium ซึ่งได้จากการเพาะเมล็ดและเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญบนวุ้นอาหารมาแช่ในสารละลายโคลชิซีนที่มีความเข้มข้น 0.05 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เวลาแช่ต่างกันแล้วแต่ชนิดของกล้วยไม้ที่ทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 4 D. Caesar เลขที่ 1 และ D. Majestic ส่วนใหญ่เป็นต้นอ่อนมี protocorm like body ปนบ้างเล็กน้อย ส่วนชนิดอื่น ๆ เป็น callus และ protocorm like body (ภาพที่ 1) สารละลายโคลชิซีนอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำความดัน 1 กิโลกรัม ต่อหนึ่งตารางเซ็นติเมตร เวลา 15 นาที นำ flask ไปวางบนเครื่องเขย่า (reciprocating shaker) เขย่าประมาณ 60 ครั้งต่อนาที เมื่อครบกำหนดเอา callus protocorm like body และต้นอ่อนขึ้นจากสารละลายโคลชิซีน มาเลี้ยงต่อในวุ้นอาหารหรือในอาหารเหลว หลังจากนี้ประมาณ 1 เดือน เปลี่ยนวุ้นอาหารใหม่ เพราะมีเนื้อเยื่อบางส่วนตายไปในระยะนี้ ย้ายเฉพาะเนื้อเยื่อสีเขียวใส่ในวุ้นอาหารใหม่ เมื่อกล้วยไม้เจริญเป็นต้นวุ้นอาหารที่ใช้ก็เตรียมแบบง่าย ๆ โดยไม่ใส่ vitamin และ amino acid

การตรวจสอบ polyploid

1. นับจำนวนโครโมโซมจากปลายราก
2. วัด guard cell ของใบ (จากต้นที่ปลูกไว้ในเรือนต้นไม้)
3. วัดความหนาของใบ diploid เปรียบเทียบกับ tetraploid และ triploid เปรียบเทียบกับ hexaploid (จากต้นที่ปลูกในเรือนต้นไม้)

ภาพที่ 1 ระยะต่างๆของเนื้อเยื่อลูกผสม Dendrobium ก่อนที่จะนำไปแช่สารละลายโคลชิซีน ภาพบนเป็น callus ล่างซ้ายและขวาเป็น protocorm like body และต้นอ่อนตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซีนและระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง

| ชนิดของกล้วยไม้ | เริ่มจาก | วันที่เริ่มแช่ในสารละลายโคลชิซีน | ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซีน (เปอร์เซ็นต์) | ระยะเวลาที่แช่ (วัน) |
|---|---|---|---|---|
| D. Caesar เลขที่ 1 | meristem culture | 19 ก.ย.2514 | 0.2 | 3 |
| | | 19 ต.ค.2514 | 0.05 | 10 |
| D. Caesar เลขที่ 2 | " | 19 พ.ย.2514 | 0.2 | 3 |
| | | | 0.05 | 10 |
| D. Caesar เลขที่ 3 | " | 27 ก.ค.2513 | 0.2 | 4 |
| D. superbiens เลขที่ 1 | " | 8 เม.ย.2514 | 0.2 | 3 |
| D. superbiens เลขที่ 2 | " | 4 ก.พ.2515 | 0.05 | 10 |
| D. Desaputra | " | 20 ก.ย.2514 | 0.2 | $2\frac{1}{6}$, 3 |
| ⊗ D. May Neal | seed culture | 18 ต.ค.2514 | 0.2 | 3, 4 |
| | | 7 ธ.ค.2514 | 0.05 | 10 |
| D. Majestic | meristem culture | 18 ต.ค.2514 | 0.2 | 3, 4 |
| | | 7 ธ.ค.2514 | 0.05 | 10 |
| D. Lim Chong Min x D. formosum | seed culture | 24 ก.ค.2513 | 0.2 | 1 |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 2 D. Lady Hamilton × D. May Neal ซึ่งเป็น triploid ( 2n = 57 ) เกิดเป็น polyploid ขึ้นเองในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ บน จำนวนโครโมโซม triploid ( 2n = 57 ) และ hexaploid ( 2n = 114 ) ล่างซ้ายและขวา ต้น triploid และ hexaploid ซึ่งมีการเจริญใกล้เคียงกัน hexaploid มีลำต้นอ้วนกว่า ใบหนากว่าและยน

การตรวจนับจำนวนโครโมโซม

เมื่อ callus protocorm like body เจริญเป็นต้นและมีรากแล้ว ตัดรากนับจำนวนโครโมโซม โดยเลือกรากใส ๆ ปลายรากมีสีเขียวขุ่นเล็กน้อย ตัดรากยาวประมาณ 3 – 4 ม.ม. แช่ใน ∝-bromonaphthalene 5 – 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 5 °C ซึ่งช่วยให้โครโมโซมหดตัวและกระจายมากขึ้น โครโมโซมอยู่ในระยะ metaphase นาน(Vajrabhaya, personnal communication) เมื่อครบกำหนดเท ∝-bromonaphthalene ทิ้ง fix รากด้วย acetic acid 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลาครึ่งชั่วโมง แล้วล้างรากด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที เก็บรากไว้ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ในตู้เย็น ย้อมสี Feulgen ตามวิธีของ Darlington and La Cour (1962) หลังจาก hydrolyse รากเป็นเวลา 10 นาที ใน 1N HCL ที่อุณหภูมิ 60°C การทำสไลด์ใช้เฉพาะปลายรากยุ่ย ๆ เท่านั้น ในระยะสุดท้ายนี้ใช้สี acetic acid carmine หรือ acetoorcein ใส่เข้าไปด้วยเพื่อให้โครโมโซมติดสีมากขึ้น (modified Darlington and La Cour, 1962)

การวัด guard cell

เปรียบเทียบความยาวและความกว้างของ guard cell ระหว่าง diploid กับ tetraploid และ triploid กับ hexaploid โดยวัดได้จากการลอกผิวใบด้านล่าง บริเวณกลางใบของใบกลาง ๆ ลำต้น โดยเลือกต้นที่มีขนาดใกล้เคียงกัน ใช้ diploid และ tetraploid ของ D. Caesar เลขที่ 2 อย่างละ 4 ต้น และ D. May Neal "Srisobhon" อย่างละ 2 ต้น วัด guard cell ของ D. Caesar เลขที่ 1 ซึ่งเป็น triploid และ hexaploid อย่างละ 4 ต้น และ

D. Lady Hamilton x D. May Neal ที่เป็น triploid และ hexaploid อย่างละ 5 ต้น วัดต้นละ 10 เซล ด้วย eye piece micrometer (1 microunit = 11 $\mu$) ใช้กำลังขยาย 16 x 40 เท่า วัดความกว้างและยาวของคู่ guard cell โดยวัดผ่านจุดกึ่งกลางของ Stoma ถึงขอบของคู่ guard cell หาค่าเฉลี่ยความกว้างและยาวของคู่ guard cell แต่ละต้น (ตารางที่ 15 และ 16) แล้วทดสอบโดยใช้ Student's t test เพื่อหาว่าความกว้างและยาวของคู่ guard cell ของ diploid กับ tetraploid และ triploid กับ hexaploid เหมือนกันหรือไม่

การวัดความหนาของใบ

ใช้ screw micrometer วัดความหนาของใบจากต้นที่มีขนาดใกล้เคียงกัน โดยวัดต้นละ 2 * ใบ ที่อยู่ในระดับเดียวกันและสมบูรณ์ที่สุด ในแต่ละใบจะวัดบริเวณกลางใบทางด้านซ้ายและขวาของเส้นกลางใบ แล้วหาค่าเฉลี่ยความหนาของใบแต่ละต้น นำมาทดสอบทางสถิติโดยใช้ Student's t test เพื่อหาว่าความหนาของใบ diploid กับ tetraploid และ triploid กับ hexaploid เหมือนกันหรือไม่ ในการวัดความหนาของใบเพื่อเปรียบเทียบใบของ diploid กับ tetraploid นี้ ได้ใช้ D. Caesar เลขที่ 2 และ D. May Neal ส่วนใบ triploid กับ hexaploid วัดใน D. Lady Mamilton x D. May Neal จาก D. Caesar เลขที่ 2 วัด diploid และ tetraploid อย่างละ 4 ต้น D. May Neal วัด diploid และ tetraploid อย่างละ 2 ต้น D. Lady Hamilton x D. May Neal วัด triploid และ hexaploid อย่างละ 5 ต้น ผลการวัดแสดงอยู่ในตารางที่ 17 และ 18

---

* นอกจาก D. May Neal วัดต้นละ 4 ใบ

การเปรียบเทียบลักษณะของลำต้นและส่วนต่าง ๆ ของดอก diploid กับ near tetraploid ของ D. Caesar เลขที่ 3

ได้เปรียบเทียบขนาดดอกของ near tetraploid (77 โครโมโซม) กับ diploid โดยวัดส่วนต่าง ๆ ของดอกเปรียบเทียบกันอย่างละ 5 ดอก คือวัดความกว้างและยาวของ dorsal sepal, lateral sepal และ petal (อย่างละ 1 กลีบ) labellum และ mid lobe สำหรับความหนาของกลีบดอก ความหนาของใบ (วัดต้นละ 4 ใบ วิธีการเหมือนกับที่กล่าวมาแล้ว) และขนาดก้านชอดอกของ diploid และ tetraploid วัดโดยใช้ screw micrometer ขนาดความกว้างและยาวของคู่ guard cell วัดต้นละ 10 เซล (วิธีการเหมือนที่กล่าวมาแล้ว) ผลการวัดดังแสดงในตารางที่ 19 ได้ทดสอบทางสถิติด้วย Student's t test เพื่อดูว่าส่วนต่าง ๆ ของดอก ขนาดความกว้างและยาวของคู่ guard cell และความหนาของใบของ diploid และ near tetraploid เหมือนกันหรือไม่ นอกจากนี้ได้ทำสไลด์ดูลักษณะของ pollen วิธีทำโดยถ่าม pollinium ในน้ำเพื่อให้ pollen quartet กระจายออกจากกัน และนำมาย้อมสี acetoorcein 2 เปอร์เซ็นต์ วัดความกว้างและยาวของ pollen quartet ของ diploid และ near tetraploid และนำ pollen ของ diploid และ near tetraploid ไปใส่ใน stigma fluid ของดอกต้นอื่น เพื่อดูเปอร์เซ็นต์การงอกของ pollen ด้วย