

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง



พืชทดลอง

กล้วยไม้ที่ใช้ทดลองได้จาก ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชรารักษ์ เป็นลูกผสมสกุล Aranda 5 ชนิด ได้แก่ Aranda x Wendy Scott 'No.2' Aranda x Wendy Scott 'Blue Bird' Aranda x Wendy Scott Aranda x Christine 'No.9' Aranda x Christine 'No.80' และ Arachnis hookerana 'luteola' (Rehb. f.) (ดูภาคผนวก) ลูกผสมทั้ง 6 ชนิดนี้ ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ Aranda x Wendy Scott 'No.2' ได้ callus และ protocorm-like body (plb) จากศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชรารักษ์ ส่วนชนิดอื่นผู้เขียนเลี้ยงเนื้อเยื่อเอง

กล้วยไม้ที่ใช้ทั้งหมดเป็น diploid แบ่งเป็น 2 สกุล คือ Aranda ซึ่งเป็นลูกผสมข้ามสกุลระหว่าง Vanda และ Arachnis จึงมีชุดของโครโมโซมเป็น 2 พก (AV) ส่วน Arachnis มีชุดของโครโมโซมเหมือนกันทั้ง 2 ชุด (AA)

อุปกรณ์

1. ขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 50 มล. และ 250 มล.
2. หลอดแก้วทดลองขนาด 170 x 20 มม.
3. หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ Philip TL 40W/54
4. เครื่องเขย่าแบบ reciprocating shaker ซึ่งตั้งไว้ประมาณ 60 ครั้ง/นาที

อาหารและสารเคมีที่ใช้

1. อาหารสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อตามสูตรของ ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชรากัย (T23b) ซึ่งดัดแปลงจาก Murashige and Skoog, (1962); Schenk and Hildebrandt, 1971; Nitsch, 1972 (ดูภาคผนวก) โดยแบ่งเป็น 3 ชนิด คือ
 - 1.1 อาหารเหลวไม่ใส่น้ำตาล
 - 1.2 วันอาหารไม่ใส่น้ำตาล
 - 1.3 วันอาหารไม่ใส่น้ำมะพร้าว
2. สารละลายโคลชิซินในน้ำกลั่นเข้มข้น 0.05 และ 0.1% อบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 120° ซ. ความดัน 1 กก./ซม.² เป็นเวลา 15 นาที
3. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจนับโครโมโซม
 - 3.1 α -Bromonaphthalene (reagent grade) 2-3 หยดในน้ำ 1000 มล.
 - 3.2 Acetic acid 90%
 - 3.3 Alcohol 70%
 - 3.4 Aceto-orcein 2% เตรียมโดยละลาย orcein 2 gm. ใน acetic acid 45% 100 มล. อุ่นให้ร้อนแต่ไม่เดือด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วกรอง
 - 3.5 Schiff's reagent ตามวิธีของ Darlington and La Cour (1962)

วิธีทำการทดลอง

การเลี้ยงเนื้อเยื่อ เลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญของกล้วยไม้ลูกผสมในวันอาหารตามวิธีของ Morel (1964); Sagawa, Shoji and Shoji (1966); Vajrabhaya and Vajrabhaya (1970) ที่อุณหภูมิ 27 ± 2° ซ. ให้แสงวันละ 14 ชม. มีความเข้มแสงประมาณ 2000-3000 Lux. เมื่อเลี้ยงในวันอาหาร 1 เดือน จึงย้ายลงไปเลี้ยงในอาหารเหลวไม่ใส่น้ำตาล (Kunisaki, Kim and Sagawa, 1972) วางไว้บนเครื่องเขย่า เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ จนกระทั่งได้ callus และ plb มากพอ จึงนำไปแช่ในสารละลายโคลชิซิน

การแช่ในสารละลายโคลชิซิน ก่อนแช่ callus และ plb. ในสารละลายโคลชิซิน เปลี่ยนอาหารเหลวใหม่ เพื่อให้ได้เซลล์ที่มีการแบ่งตัวมาก ๆ ประมาณ 10 วัน จึงย้าย callus และ plb. ลงแช่ในสารละลายโคลชิซิน 0.05 และ 0.1% แล้ววางไว้บนเครื่องเขย่า (กัญญา ไชยเจริญ 2516) Aranda 5 ชนิดแช่ในสารโคลชิซิน 9 วัน ส่วน Arachnis 3 วัน แล้วย้าย callus และ plb. นั้น ขึ้นเลี้ยงบนจานอาหารที่ไม่ใส่น้ำตาล 1 เดือน จึงย้ายมาเลี้ยงบนจานอาหารไม่ใส่น้ำมะพร้าว เลี้ยงบนจานอาหารชนิดนี้ไปเรื่อย ๆ เปลี่ยนจานอาหารทุก 2 เดือน จนเจริญเป็นต้นใหญ่พอที่จะนำมาศึกษาโครโมโซมได้

การนับจำนวนโครโมโซมจากปลายราก เมื่อ callus และ plb. เจริญเป็นต้นจนมีรากแล้ว ตัดรากที่งอกใหม่ ๆ ปลายเสี้ยวใสประมาณ 1 ซม. แช่ใน α -bromonaphthalene 3 ซม. ที่อุณหภูมิ 5°C เมื่อครบเวลาแล้วเท bromonaphthalene ที่ แช่ใน acetic acid 90% 30 นาที แล้วล้างรากด้วย alcohol 70% 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที สุดท้ายเก็บไว้ใน alcohol 70% ที่ 5°C เมื่อจะนับโครโมโซม นำรากที่แช่ใน alcohol 70% มาล้างด้วยน้ำหลาย ๆ ครั้ง hydrolyse ใน HCl 1 N. ที่ 60°C 8 นาที แล้วเตรียมสไลด์แบบ Feulgen squash ตามวิธีของ Darlington and La Cour (1962) การทำสไลด์ใช้เฉพาะปลายรากที่ติดสีแดงเข้มเท่านั้น ใส aceto-orcein ขณะทำสไลด์เพื่อให้โครโมโซมติดสีดีขึ้น (modified Darlington and La Cour, 1962) โดยนับโครโมโซมต้นละ 5 เซลล์

การวัดความกว้าง ยาวของ guard cell เปรียบเทียบความกว้าง ยาวของ guard cell ระหว่าง diploid กับ tetraploid ของกล้วยไม้ลูกผสมทั้ง 6 ชนิดโดยลอกผิวใบด้านล่าง บริเวณกลางใบของใบกลาง ๆ ลำต้น เลือกต้นที่มีขนาดใกล้เคียงกัน Aranda ทั้ง 5 ชนิด วัดอย่างละ 5 ต้น ๆ ละ 5 เซลล์ Arachnis วัดอย่างละ 3 ต้น ๆ ละ 5 เซลล์ ด้วย eyepiece micrometer ใช้กำลังขยาย 8 x 40 เท่า วัดความกว้าง ยาวของ guard cell โดยวัดผ่านจุดกึ่งกลางของปากใบ ถึงขอบของคู่ guard cell หาค่าเฉลี่ยความกว้าง ยาวของคู่ guard cell แต่ละต้น (ตารางที่ 10,11,12) แล้วทดสอบโดยใช้ Student's t test (Steel and Torrie, 1960) เพื่อหาว่าความกว้าง ยาวของ guard cell ของ diploid และ tetraploid มีขนาดเท่ากันหรือต่างกันหรือไม่

การวัดความหนาใบ ใช้ screw micrometer วัดความหนาของใบจากต้นที่มีขนาดใกล้เคียงกัน เปรียบเทียบระหว่าง diploid และ tetraploid โดยวัดจาก Aranda ทั้ง 5 ชนิดอย่างละ 5 ต้น Arachnis อย่างละ 3 ต้น วัดต้นละ 2 ใบ ที่อยู่ในระดับเดียวกัน และสมบูรณ์ที่สุด ในแต่ละใบวัดบริเวณกลางใบทางด้านซ้ายและขวาของเส้นกลางใบ แล้วหาค่าเฉลี่ยความหนาของแต่ละใบ นำมาทดสอบทางสถิติ โดยใช้ Student's t test (Steel and Torrie, 1960) ผลการวัดแสดงอยู่ในตารางที่ 13, 14, 15 Aranda x Wendy Scott 'No.2' วัดจากต้นที่นำออกมาเลี้ยงที่เรือนต้นไม้نان 6 เดือนแล้ว ส่วนอีก 5 ชนิดวัดจากต้นที่เพิ่งจะนำออกมาจากวันอาหาร