บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

กล้วยไม้รองเท้านารี

กล้วยไม้รองเท้านารีพันธุ์พื้นเมือง 7 ชนิด จาก 2 subgenera ที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ ดังนี้

SUBGENUS BRACHYPETALUM

กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน

Paphiopedilum concolor (Batem.) Pfitz.

ได้มาจากจังหวัดปราจีนบุรี จำนวนต้นที่ใช้ทดลอง 7 ต้น โครโมโซมได้จากราก 9 ราก

กล้วยไม้รองเท้านารีดอกสีครีม

Paphiopedilum godefroyae (Godefr.) Pfitz.

ได้จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี จำนวนต้นที่ใช้ทดลอง 8 ต้น ใช้ราก 13 ราก

กล้วยไม้รองเท้านารีสีขาว

Paphiopedilum niveum (Rchb.f.) Pfitz.

ได้จากหมู่เกาะอ่างทอง จังหวัดพังงา ราก 9 รากที่นำมาศึกษาโครโมโซมได้มาจาก 5 ต้น

SUBGENUS OTOPEDILUM

SECTION MYSTROPETALUM

กล้วยไม้รองเท้านารีเมืองกาญจน์

Paphiopedilum parishii (Rchb.f.) Pfitz.

ได้มาจากจังหวัดกาญจนบุรี พืชที่ใช้ทดลอง 9 ต้น ใช้ราก 10 ราก

SECTION NEUROPETALUM

กล้วยไม้รองเท้านารีกระบี่

Paphiopedilum exul (O'Brien) Pfitz.

ได้จากจังหวัดกระบี่ ราก 15 รากที่นำมาศึกษาโครโมโซมได้จาก 10 ต้น

กล้วยไม้รองเท้านารีอินทนนท์

Paphiopedilum villosum (Lindl.) Pfitz.

ได้มาจากดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ ทั้ง 8 ต้น ซึ่งรวบรวมได้ 11 ราก ใช้ในการศึกษาคาริโอไทพ์

SECTION PHACOPETALUM

กล้วยไม้รองเท้านารีกางกบ

Paphiopedilum callosum (Rchb.f.) Pfitz.

ได้จากจังหวัดเชียงใหม่ พืชที่ใช้ทดลอง 9 ต้น โครโมโซมได้จาก 11 ราก

สารเคมีที่ใช้

1. α -Bromonapthalene
2. Acetic acid 90%
3. Ethyl alcohol 70%
4. Normal hydrochloric acid
5. Aceto - orcein 2%
6. Schiff's reagent เตรียมตามวิธีของ Darlington and La Cour (1962)

อุปกรณ์การปลูกกล้วยไม้รองเท้านารี

- กระถาง
- อิฐมอญ
- ปุ๋ยหมัก
- มอส
- ดินปลูก
- เศษถ่านละเอียด
- ทรายหยาบ

อุปกรณ์เกี่ยวกับการถ่ายภาพ

- กล้อง Olympus P.M.7
- Film Panatomic-X

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การปลูกกล้วยไม้รองเท้านารีเพื่อตัดราก

นำกล้วยไม้รองเท้านารีที่ได้จากจังหวัดต่าง ๆ มาปลูกในเรือนต้นไม้ โดยใช้เครื่องปลูกให้ใกล้เคียงกับธรรมชาติ คือ

รองเท้านารีคางกบ

(Paphiopedilum callosum (Rchb.f.) Pfitz.)

จะออกรากเมื่อปลูกในภาชนะที่ใช้อิฐก่อสร้างที่ทุบให้เป็นก้อนเล็ก ๆ ใส่ไว้ในชั้นล่างสุด ราว 1 ใน 3 ของภาชนะ ชั้นบนใช้เศษถ่านละเอียดผสมกับเปลือกถั่วลิสงและทรายหยาบเล็กน้อย ผสมกันเทลงบนอิฐ

ส่วน Paphiopedilum concolor (Batem.) Pfitz., Paphiopedilum exul (O'Brien) Pfitz., Paphiopedilum godefroyae (Godefr.) Pfitz., Paphiopedilum niveum (Lindl.) Pfitz., และ Paphiopedilum parishii (Rchb.f.) Pfitz. ปลูกในกระถางที่ใส่ปุ๋ยหมัก ของเทศบาล 8 – 9 ส่วน ทรายหยาบ 1 ส่วน และอิฐก่อสร้างที่ทุบละเอียดเล็กน้อยผสมให้เข้ากัน

ส่วนรองเท้านารีอินทนนท์

(Paphiopedilum villosum (Lindl.) Pfitz.)

ซึ่งในธรรมชาติเป็น epiphyte ฉะนั้นเมื่อนำมาปลูกจึงใช้มอส ใส่กระถางโดยห่อหุ้มรากเก่าของกล้วยไม้ไว้ให้มากที่สุด เพื่อจะให้รากได้รับความชุ่มชื้นเหมือนในธรรมชาติ

การปลูกกล้วยไม้ด้วยเครื่องปลูกชนิดต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้น พบว่ากล้วยไม้รองเท้านารีออกดอกแทบทุกชนิด แต่ออกรากน้อยไม่เพียงพอที่จะใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ดังนั้นจึงทำการทดลองเพื่อให้กล้วยไม้รองเท้านารีออกรากมากขึ้นโดย

ก. ใช้ Indolebutyric acid ความเข้มข้น 10 p.p.m. ใส่ในขวดสีดำแล้วปลูกกล้วยไม้รองเท้านารี แล้วใช้เครื่องพ่นอากาศช่วยพ่นให้อากาศตลอดเวลา

ข. ใช้ Indolebutyric acid ความเข้มข้น 100 p.p.m. กระทำเช่นเดียวกับข้อ ก.

ก. ใช้น้ำประปา และปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ ก.

ผลการทดลองใน 3 ข้อข้างต้น ใช้เวลาทดลอง 3 เดือน ปรากฏว่า ต้นกล้วยไม้รองเท้านารีไม่มีรากใหม่เกิดขึ้นเลย ทั้งนี้อาจเนื่องจากสาเหตุหลายประการ เช่น

1. ความเข้มข้นของ Indolebutyric acid ไม่เหมาะสม

2. ปริมาณของอากาศที่ได้รับจากเครื่องพ่นอากาศมีมากหรือน้อยเกินไป ไม่เหมาะสม

3. ขณะทดลองทำระหว่างเดือนธันวาคมถึงกุมภาพันธ์ และมีนาคมถึงพฤษภาคม อาจเป็นช่วงที่กล้วยไม้รองเท้านารีอยู่ในระยะพักตัว ไม่มีการแตกรากใหม่ก็ได้

เมื่อปลูกกล้วยไม้รองเท้านารี ตามวิธีการที่ใช้เครื่องปลูกให้คล้ายคลึงกับธรรมชาติที่สุดดังได้กล่าวแล้ว ต้องรดน้ำวันละครั้งโดยใช้ฝักบัวรดน้ำหรือใช้เครื่องฉีดให้เป็นฝอย รดพอให้ชุ่มชื้น และต้องให้ปุ๋ย 2 สัปดาห์ต่อครั้ง ส่วนยาฆ่าแมลงนั้นให้เดือนละครั้ง ภายหลังจากเลี้ยงจนงอกงามดีแล้ว เมื่อมีดอกก็ถ่ายรูปแล้วนำไป identify ให้ถูกต้องว่าเป็นชนิดใด ภายหลังดอกโรยแล้วเปลี่ยนกระถางและเครื่องปลูก สางรากที่เน่า ๆ ทิ้งเพื่อจะได้มีรากใหม่เกิดขึ้น

2. <u>การศึกษาทาง Cytology</u>

ต้นกล้วยไม้รองเท้านารีส่วนมากราวเดือนสิงหาคมถึงพฤศจิกายนจะมีรากใหม่ที่มีลักษณะขาวใสเหมาะสมที่จะใช้ศึกษาคาริโอไทพ์ ในการศึกษาคาริโอไทพ์ครั้งนี้ได้มาจากการแบ่งเซลล์ปลายรากโดยเฉพาะในระยะ metaphase การเตรียมเซลล์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการจัดคู่ของโครโมโซม แบ่งเป็นขั้น ๆ ดังนี้

2.1 Pretreatment นำรากซึ่งส่วนมากมีขนาดค่อนข้างใหญ่มาผ่าตรงปลายรากออกเป็น 2–4 ส่วน เพื่อช่วยให้น้ำยาเข้าได้ทั่วถึง แช่ใน α-bromonapthalene ที่อุณหภูมิ 4° C

α-bromonapthalene 1 หยดต่อน้ำประปา 1,000 ลูกบาศก์เซนติเมตร) การ treat นี้ ช่วยทำให้การแบ่งเซลล์หยุดอยู่ในระยะ metaphase และโครโมโซมหดตัว เพื่อสะดวกที่จะใช้ศึกษารูปร่างและจำนวนของโครโมโซม ส่วนระยะเวลาที่แช่รากใน α-bromonapthalene ประมาณ 24–28 ชั่วโมง แล้วแต่ชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารี ดังแสดงในตารางที่ 1

หลังจาก pretreatment ด้วย α-bromonapthalene แล้ว

2.2 fix รากด้วย 90% acetic acid 30 นาที

2.3 เก็บรากไว้ใน 70% alcohol ที่ 4° C.

2.4 การเตรียมสไลด์ นำรากที่แช่ไว้ใน 70% alcohol ไป hydrolyse ใน normal hydrochloric acid ที่อุณหภูมิ 60° C. โดยล้างรากให้ปราศจาก alcohol เพื่อให้สีย้อมติดเซลล์ได้ดี กล้วยไม้รองเท้านารีที่ทดลองครั้งนี้ใช้เวลา hydrolyse 9 นาทีทุกชนิด แล้วย้อมสี Schiff's reagent เตรียมตามวิธีของ Darlington and La Cour (1962) ประมาณ 1 ชั่วโมง การทำสไลด์ใช้เฉพาะปลายรากที่ติดสีเข้มกว่าส่วนอื่น ๆ เท่านั้น โดยหยด aceto-orcein ลงบนสไลด์ เพื่อช่วยให้โครโมโซมติดสีมากขึ้น (modifield Darlington and La Cour)

ตารางที่ 1 เวลา pretreatment รากกล้วยไม้รองเท้านารีชนิดต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารี
24	Paphiopedilum villosum (Lindl.) Pfitz.
26	Paphiopedilum exul (O'Brien) Pfitz.
28	Paphiopedilum concolor (Batem.) Pfitz.
28	Paphiopedilum godefroyae (Godefr.) Pfitz.
28	Paphiopedilum niveum (Rchb.f.) Pfitz.
28	Paphiopedilum parishii (Rchb.f.) Pfitz.
28	Paphiopedilum callosum (Rchb.f.) Pfitz.

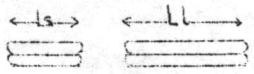
2.5 การศึกษาโครโมโซม นำสไลด์ที่เตรียมไว้มาเลือกหาเซลล์ที่นิวเคลียสกำลังแบ่งตัวในระยะ metaphase และโครโมโซมกระจายดี แต่ละเซลล์ที่เลือกมีการหดตัวของโครโมโซมเท่า ๆ กัน โดยนับจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้รองเท้านารีแต่ละชนิด 40 เซลล์ แล้วเลือกเซลล์ที่โครโมโซมกระจายดีมาเพียง 20 เซลล์ ถ่ายรูปโดยใช้กำลังขยาย 1000 เท่า เหมือนกันทุกเซลล์และทุกชนิด

3. การศึกษา Karyotype

ในการจำแนกหมวดหมู่ของโครโมโซม ต้องวัดขนาดของโครโมโซม เพื่อให้มีความผิดพลาดน้อยที่สุด การวัดจึงวัดจากรูปที่ขยายใหญ่ 3500 เท่า จากของจริง โดยวาดรูปขยายของโครโมโซมจากฟิล์ม แล้วนำไปวัดความยาวของโครโมโซมทุก ๆ แท่ง (หน่วยเป็นมิลลิเมตร) โดยใช้ตำแหน่ง centromere เป็นจุดศูนย์กลาง แล้ววัดความยาวของแขนโครโมโซมไปยังปลายทั้งสองข้าง ในเซลล์ที่โครโมโซมมีสองโครมาติด วัดความยาวโครมาติดทั้งสองอันแล้วหาค่าเฉลี่ย

ความยาวของ short arm (Ls)

ความยาวของ long arm (Ll)



แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าความยาวของแต่ละโครโมโซม (longer absolute, LT) ค่า relative length (R.L.) และค่า centromeric index (C.T.) ตามวิธีของ Lejeune (1965)

$$\text{Longer absolute (LT)} = Ls + Ll$$

$$\text{Relative length (R.L.)} = \frac{\text{ความยาวของแต่ละโครโมโซม}}{\text{ความยาวของโครโมโซมทั้งหมดในหนึ่งเซล}}$$

$$= \frac{LT}{\Sigma LT}$$

$$\text{Centromeric index (C.I.)} = \frac{\text{ความยาวของ long arm}}{\text{ความยาวของโครโมโซมนั้น}}$$

$$= \frac{Ll}{LT}$$

ค่า relative length และ centromeric index นี้ ใช้นำมาจับคู่โครโมโซมได้ เพราะโครโมโซมที่เป็นคู่กัน (homologous chromosome) ย่อมมีค่า relative length และ centromeric index เท่ากันหรือใกล้เคียงกัน เมื่อจับคู่ของโครโมโซมแต่ละคู่ได้แล้ว นำโครโมโซมทั้งหมดมาจัด Idiogram โดยเรียงลำดับคู่ของโครโมโซมจากคู่ที่ยาวที่สุดไปหาคู่ที่สั้นที่สุด โดยถือว่าโครโมโซม ที่มีความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของโครโมโซมคู่ที่ยาวที่สุด จัดเป็นโครโมโซมขนาดเล็ก โครโมโซมขนาดกลางคือโครโมโซมที่มีค่า relative length ระหว่าง .060 – .029 ส่วนโครโมโซมขนาดใหญ่คือ โครโมโซมที่มีค่า relative length ตั้งแต่ .061 ขึ้นไป (ดูวิธีคิดในภาคผนวก)

นำค่า relative length และ centromeric index ของโครโมโซมแต่ละคู่ทั้ง 20 เซลล์ มาคำนวณหาค่า mean, standard deviation และ standard error ของ mean เพื่อ plot graph ตามวิธีของ Tymowska and Kobel (1972) graph ที่ได้จะบอกความสัมพันธ์ของโครโมโซมแต่ละคู่ว่าต่างกันหรือเหมือนกันอย่างไร

เมื่อทำคาริโอไทพ์ครบทั้ง 7 ชนิด แล้วนำมาเปรียบเทียบว่า ชนิดใดมีคาริโอไทพ์เหมือนกัน และแตกต่างกันอย่างไร

i 18316220